

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra parazitologie

**Studijní program: Biologie**

**Studijní obor: Parazitologie**



Bc. Anna Vanclová

**Membránový proteom plastidu euglenidů**

Membrane proteome of euglenid plastid

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Vladimír Hampl, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Róbert Šuťák, Ph.D.

Praha 2014

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14. srpna 2014

Anna Vanclová, *m.p.*

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli Mgr. Vladimíru Hamplovi, Ph.D. za odborné vedení, motivaci a konzultace, bez nichž by tato práce nemohla vzniknout, konzultantovi RNDr. Róbertu Šuťákovi, Ph.D. a „neoficiálnímu konzultantovi“ Mgr. Pavlu Doležalovi, Ph.D. za množství cenných rad a připomínek. Poděkování patří rovněž prof. RNDr. Juraji Krajčovičovi, CSc. a Mgr. Janě Szabové za poskytnutí zkoumaných organismů a metodických rad ohledně práce s nimi, a Mgr. Anně Karnkowské, Ph.D. a Mgr. Vojtěchu Žárskému za pomoc s bioinformatickou analýzou dat. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celému týmu laboratoře evoluční protistologie za vytvoření přátelské a motivující atmosféry, zejména pak Mgr. Lukáši Novákovi za psychickou podporu a obsahové i stylistické připomínky a korektury.

## ABSTRAKT

Euglenophyta jsou monofyletická podskupina euglenidů vymezená přítomností zeleného, třemi membránami obaleného plastidu nabytého sekundární endosymbiózou s chlorophytí řasou. Mechanismus, jímž jsou do těchto plastidů transportovány jaderně-kódované proteiny, je dosud velmi málo probádán. Bylo zjištěno, že k vnější membráně putují proteiny ve váčcích postupujících z ER přes Golgi, neví se však, na jakém principu tyto rozeznávají cílovou membránu a splývají s ní. Translokační systém vnitřních dvou membrán je zcela neznámý, na základě srovnání s ostatními plastidy se nabízí možnost přítomnosti homologů komplexů TOC a TIC. V rámci této práce byla analyzována sekvenční data z proteomu izolovaných membrán plastidu modelového organismu *Euglena gracilis* a transkriptomu *E. gracilis* a jejího vzdáleného příbuzného, *Eutreptiella gymnastica*. Bylo zkoumáno, zda se v nich nacházejí proteiny potenciálně zapojené do transportu a homology proteinů transportních systémů známých z plastidů jiných organismů (TOC/TIC, „ERAD-like“ transport, SNARE). Veškeré naše výsledky jsou však negativní. Je těžké určit, zda toto zjištění naznačuje možnou nepřítomnost komplexů TOC a TIC v plastidu euglenidů, či spíše nedostatečnost použitých dat.

Klíčová slova: Euglenophyta, sekundární plastid, targeting proteinů, signální domény, TOC/TIC, ERAD-like transport

## ABSTRACT

Euglenophyta are monophyletic group of euglenids defined by presence of green, three membrane-bound plastid which has been acquired via secondary endosymbiosis with chlorophyte alga. Mechanism of transport of nuclear-encoded proteins into this plastid is not yet completely understood. It was observed that the proteins are transported to the outermost plastid membrane in vesicles passing through ER and Golgi, but the mechanism of their recognition and fusion with the target membrane remains unclear. Translocation system of inner two membranes is still completely unknown, regarding the situation in other plastids, it has been proposed that homologues of TOC and TIC complexes are present. In this work we analyzed sequence data from proteome of isolated plastid membranes of model organism *Euglena gracilis* and transcriptome of *E. gracilis* and its distant relative *Eutreptiella gymnastica*. We studied whether they contain proteins potentially involved in transport and homologues of proteins of transport systems known from plastids in other organisms (TOC/TIC, ERAD-like transport, SNARE). However, all our results are negative. It is hard to determine whether these findings indicate the possible absence of TOC and TIC complexes in euglenid plastid, or rather the insufficiency of our data.

Key words: Euglenophyta, secondary plastid, protein targeting, signal domains, TOC/TIC, ERAD-like transport

# OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	8
2.1	Vznik organel endosymbiózou .....	8
2.1.1	Endosymbiotická teorie .....	8
2.1.2	Přechod mezi endosymbiontem a organelou .....	8
2.1.3	Role membrán ve vzniku a evoluci semiautonomních organel.....	9
2.2	Evoluce plastidu .....	10
2.2.1	Společný původ a horizontální přenos plastidů .....	10
2.2.2	Výskyt sekundárních plastidů napříč eukaryoty .....	11
2.2.3	Evoluce vyšších plastidů a počet endosymbiotických událostí.....	12
2.3	Struktura plastidů.....	13
2.4	Transport proteinů do plastidu.....	13
2.4.1	Transport proteinů do semiautonomních organel .....	13
2.4.2	Transport proteinů do primárních plastidů.....	14
2.4.3	Transport proteinů do sekundárních a vyšších plastidů .....	17
2.5	Euglenophyta .....	21
2.5.1	Obecná charakteristika skupiny .....	21
2.5.2	Plastid .....	24
2.5.3	Transport proteinů do plastidu.....	25
3	CÍLE PRÁCE.....	27
4	MATERIÁL A METODY .....	28
4.1	Původ a kultivace použitých organismů .....	28
4.1.1	Původ zkoumaných organismů .....	28
4.1.2	Složení médií a způsob kultivace.....	28
4.2	Izolace plastidů a jejich membránové frakce.....	29
4.2.1	Izolace plastidů .....	30
4.2.2	Izolace plastidových membrán .....	32

4.2.3	Ověřování čistoty vzorku.....	32
4.3	Získávání sekvenčních dat.....	37
4.3.1	Sekvenace proteinového vzorku hmotnostní spektrometrií .....	37
4.3.2	Sekvenace transkriptomu .....	38
4.4	Bioinformatická analýza dat.....	40
4.4.1	Anotace proteomu.....	40
4.4.2	Analýza N-terminálních domén.....	41
4.4.3	Predikce potenciálních transportérů v transkriptomu <i>E.gracilis</i> a <i>E. gymnastica</i> .....	42
5	VÝSLEDKY .....	45
5.1	Izolace plastidů a plastidových membrán <i>E. gracilis</i> a <i>E. gymnastica</i> .....	45
5.1.1	Kontrola čistoty izolované frakce .....	47
5.2	Izolace a sekvenace RNA <i>E. gracilis</i> .....	50
5.3	Analýza proteinových sekvencí <i>E. gracilis</i> získaných hmotnostní spektrometrií .....	51
5.3.1	Anotace membránového proteomu plastidu <i>E. gracilis</i> .....	51
5.3.2	Analýza N-terminálních signálních domén.....	57
5.4	Hledání potenciálních transportérů v transkriptomu <i>E. gracilis</i> a <i>E. gymnastica</i> a membránovém proteomu plastidu <i>E. gracilis</i> .....	58
5.4.1	Komponenty komplexů TOC a TIC .....	58
5.4.2	Komponenty dráhy ERAD.....	60
5.4.3	SNARE proteiny .....	60
6	DISKUZE .....	61
7	ZÁVĚREČNÉ SHRUTÍ .....	67
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	68
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	70

# 1 ÚVOD

Fotosyntetičtí euglenidi (Euglenoidea, kmen Euglenozoa, říše Excavata) tvoří monofyletickou skupinu Euglenophyta vymezenou přítomností zeleného sekundárního plastidu získaného endosymbiózou s prasinophytní řasou. Při této evoluční události došlo k pohlcení a zotročení eukaryotního symbionta eukaryotním hostitelem, následkem čehož jsou sekundární plastidy obaleny větším počtem membrán, v tomto případě třemi. Předpokládá se, že vnitřní dvě odpovídají membránám primárního plastidu odvozeným od cyanobakterie, původ vnější membrány dosud nebyl s jistotou určen. Stejně tak není zcela známo, jakým způsobem a za přispění kterých molekul jsou přes tyto tři membrány transportovány proteiny nezbytné pro biogenezi a funkci plastidu, avšak kódované v jádře, kam byly z endosymbionta přesunuty při procesu jeho redukce v organelu závislou na hostiteli. Zatímco vznik primárního plastidu je událost vzácná, k ustálení plastidů sekundárních i vyšších došlo v evoluci hned u několika izolovaných skupin organismů. Úroveň poznání systémů transportujících proteiny do plastidů jednotlivých skupin se různí, zdá se však, že tyto mechanismy jsou evolučně relativně konvergentní. V plastidu euglenophyt byly dosud poměrně dobře prozkoumány signální domény, na jejichž základě jsou jaderně kódované plastidové proteiny transportovány na místo určení. Bylo zjištěno, že mají prakticky stejnou strukturu a vlastnosti, jako u ostatních skupin se sekundárními plastidy, nejvíce se pak podobají signálním doménám proteinů peridinového plastidu obrněnek (Dinoflagellata), který je rovněž obalen třemi membránami namísto u sekundárních a vyšších plastidů obvyklejších čtyř. Mechanismy, kterými jsou proteiny vybavené těmito signály rozeznávány a importovány, jsou však zatím velkou neznámou. Mikroskopicky bylo pozorováno, že transportované proteiny postupují přes ER a Golgi k vnější membráně ve váčcích. Nebylo však zjištěno, jakým způsobem tyto cílovou membránu rozeznávají a splývají s ní. Na vnitřních dvou membránách se dá očekávat přítomnost homologů komplexů TOC a TIC (Translocon of outer/inner chloroplast membrane), detailně prozkoumaných u primárních plastidů a alespoň částečně přítomných i u sekundárních plastidů jiných skupin. Žádná z jejich podjednotek však dosud nebyla v dostupných datech u skupiny Euglenophyta identifikována. Tato práce si klade za cíl důkladněji zanalyzovat stávající i nová, v jejím rámci vyprodukovaná, sekvenční data z vybraných euglenophyt se zaměřením na potenciální transportéry proteinů a pokusit se popsanou situaci osvětlit.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Vznik organel endosymbiózou

#### 2.1.1 Endosymbiotická teorie

V současnosti je součástí biologického paradigmatu endosymbiotická teorie formulovaná poprvé na přelomu 19. a 20. století (Schimper 1883; Mereschkowsky 1910) a znovuobjevená, rozšířená a zpopularizovaná v 60. letech minulého století Lynn Margulisovou (Sagan 1967), která vysvětluje eukaryogenezi a vznik semiautonomních organel, tedy mitochondrií a plastidů, jako výsledek zotročení a evolučního „rozpuštění“ bakteriálního endosymbionta,  $\alpha$ -proteobakterie v případě mitochondrie a cyanobakterie v případě plastidu, v hostitelské buňce. Eukaryotní buňky jsou tedy z definice chimerického původu; navazující teorie přikládají obdobný původ také eukaryotnímu jádru, jež má zase určité archebakteriální rysy (Martin 2005; Logsdon 2010). Zatímco přítomnost mitochondrie či organely od ní odvozené je univerzálním znakem všech eukaryot – u organismů, u nichž tato nebyla dosud identifikována, je pravděpodobná její extrémní redukce či dokonce sekundární ztráta, nikoli však její primární nepřítomnost (Martin *et Müller* 1998; Karlin *et al.* 1999; Hampl *et al.* 2008) – plastidy se vyskytují v množství izolovaných eukaryotních skupin.

#### 2.1.2 Přejít mezi endosymbiontem a organelou

Mnoho organismů napříč celou eukaryotní doménou žije v symbiotických vztazích s fototrofními organismy, což jim propůjčuje schopnost fotosyntézy a tím přídatný nebo záložní zdroj energie, který pro ně může či nemusí být esenciální. Je známo množství případů, kdy organismus hostí ve své buňce endosymbionta, který je do jisté míry zotročen a funguje jako klasický plastid, nicméně není dlouhodobě udržitelný a nedochází k jeho dělení a vertikálnímu přenosu do další generace. Takoví symbionti se označují jako kleptoplastidy a setkáváme se s nimi u některých zástupců nálevníků (Laval-Peuto *et Febvre* 1986), obrněnek (Minnhagen *et al.* 2008) a dírkonošců (Bernhard *et Bowser* 1999), v jednom případě pak dokonce u mnohobuněčných organismů (Green *et al.* 2000). Každá nová generace buněk



hostitele musí takovéto plastidy získat *de novo*, „uloupit“ je (odtud termín „kleptoplastidy“), často se ostatně rekrutují z řad řas tvořících kořist hostitele, které tento pohltit, ale zcela nestrávil a naučil se využívat jejich fotosyntetický potenciál. Není přitom vyloučené, že některé známé kleptoplastidy se v budoucnosti vyvinou v plastidy pravé.

Kde je tedy hranice mezi endosymbiontem a skutečnou organelou? Z teoretického hlediska se jedná o takový stupeň integrace, kdy se evoluční zájmy symbionta a hostitele stávají týmiž, jelikož se tito rozmnožují společně a tvoří *de facto* jediný chimerický organismus. Dochází k evolučnímu rozpuštění endosymbionta neboli efektu „Cheshire Cat“, kočky Šklíby (Richmond *et* Smith 1979). Z praktického hlediska jde o nakumulování změn, které učiní endosymbionta závislým na hostiteli na molekulární úrovni: hostitel získává kontrolu nad většinou jeho proteosyntézy a replikace. Toto se realizuje přesunem esenciálních genů z jádra či nukleoidu symbionta do hostitelského jádra, kde již podléhají regulaci exprese ze strany hostitele a nikoli symbionta. Samotný genový transfer však nestačí. Je nutné zajistit, aby se proteinové produkty těchto „zotročených“ genů dostaly zpět do místa své funkce. Definitivnímu přesunu genů tedy musí předcházet vznik mechanismu pro rozpoznání jejich produktů a jejich import do budoucí organely.

Posloupnost kroků při vzniku takového mechanismu je z principu následující:

- 1) přenos kopie genu endosymbionta do jádra hostitele při zachování jeho původní verze v genomu endosymbionta
- 2) ustanovení adresové sekvence v jaderné kopii genu a mechanismu na rozpoznání a import jeho proteinového produktu do endosymbionta
- 3) delece původní verze genu v genomu endosymbionta (Cavalier-Smith 2000)

### 2.1.3 Role membrán ve vzniku a evoluci semiautonomních organel

Pro vznik mechanismů importu jaderně kódovaných proteinů do organely jsou stěžejní vlastnosti jejich membrán. Membrány jsou jedněmi z molekulárních struktur, které nikdy nevznikají *de novo* a vždy jsou odvozeny od již existující struktury. K postupným změnám jejich složení docházet může, ale pouze za předpokladu, že se tyto změny budou vertikálně šířit, k čemuž vzhledem k výše zmíněnému může docházet pouze epigenetickou cestou tzv. membránové dědičnosti (Cavalier-Smith 2000). Změna zastoupení různých typů lipidů

nejprve ve vnější vrstvě vnější membrány, posléze v obou vrstvách obou membrán, byla pravděpodobně prerekvizitou vytvoření mechanismu pro import proteinů do plastidu. Zdá se, že na složení membrán závisí správné sbalení transportovaného proteinu (Künkele *et al.* 1998) i funkce kanálu Toc75, který v plastidu transportuje proteiny opačným směrem než jeho cyanobakteriální předek, přičemž se soudí, že tato změna směru souvisí právě i s přestavbou membrány (Reumann *et al.* 1999, Sommer *et al.* 2011).

## 2.2 Evoluce plastidu

### 2.2.1 Společný původ a horizontální přenos plastidů

U zrodu plastidů jako takových stojí jediná evoluční událost, podle současných odhadů stará přibližně 1,5 miliardy let (Hedges *et al.* 2004; Yoon *et al.* 2004), při níž eukaryotní organismus integroval do své buňky cyanobakteriálního endosymbionta. Takové plastidy jsou označovány jako primární a jsou určující synapomorfii říše Archaeplastida. Jedinou známou výjimku tvoří chromatofor protista *Paulinella chromatophora* (kmen Cercozoa), nabytý zcela nezávisle a velmi nedávno, před přibližně 60 miliony let (Marin *et al.* 2005, Yoon *et al.* 2009). Do jiných skupin než Archaeplastida se plastidy dostaly horizontálním transferem. Na první pohled patrným dokladem toho, že k takovému přenosu došlo v evoluci vícekrát než jednou, je paralelní existence červených a zelených sekundárních plastidů, odvozených od řas různých skupin (Chlorophyta a Rhodophyta). Tento přenos se označuje jako sekundární endosymbióza a dochází při něm k pohlcení a zotročení nikoli cyanobakterie, ale eukaryotního organismu již vybaveného plastidem. Některé plastidy pravděpodobně vznikly dokonce sérií endosymbióz a lze je označit za terciární či kvartérní (Archibald 2009; Baurain *et al.* 2010; Dorrel *et al.* Smith 2011).

### 2.2.2 Výskyt sekundárních plastidů napříč eukaryoty

Sekundární (či vyšší) plastidy se vyskytují u následujících eukaryotních skupin:

- **Euglenophyta (Excavata)** – zelené plastidy obsahující chlorofyl *a* a *b*, obalené třemi membránami (Leedale 1967; Gibbs 1978)
- **Chlorarachniophyta (SAR)** – zelené plastidy obsahující chlorofyl *a* a *b*, obalené čtyřmi membránami, s nukleomorfem, extrémně redukováným jádrem eukaryotního endosymbionta mezi druhou a třetí membránou (Gilson *et al.* 1995; Van de Peer *et al.* 1996)
- **Heterokontophyta/Stramenopila (SAR)** – červené plastidy obsahující chlorofyl *a*, *c*<sub>1</sub>, *c*<sub>2</sub> a *c*<sub>3</sub>, obalené čtyřmi membránami (Riisberg 2009; Keeling 2009; Dorrel *et al.* 2011)
- **Apicomplexa (SAR)** – bezbarvý nefotosyntetizující, avšak esenciální, plastid (apikoplast), obalený třemi nebo čtyřmi membránami (Hopkins *et al.* 1999; Maréchal *et al.* 2001; Köhler 2005; Waller *et al.* 2005)
- **Dinoflagellata (SAR)** – množství typů: ancestrální sekundární červené plastidy obsahující chlorofyl *a* a *c*<sub>2</sub> a peridin, obalené třemi membránami (Spector 1984; Keeling 2009); sekundární zelený plastid rodu *Lepidodinium*, obsahující chlorofyl *a* a *b*, obalený čtyřmi membránami (Minge *et al.* 2010); různé červené plastidy získané patrně terciárními až kvartérními endosymbiózami, pocházející původně od skupin Haptophyta, Cryptophyta a Stramenopila, například plastidy rodů *Karenia* a *Karlodinium* (Keeling 2009; Minge *et al.* 2010)
- **Haptophyta (*incertae sedis*)** – červené plastidy obsahující chlorofyl *a*, *c*<sub>1</sub>, *c*<sub>2</sub> a *c*<sub>3</sub>, obalené čtyřmi membránami (Keeling 2009; Baurain *et al.* 2010; Dorrel *et al.* 2011)
- **Cryptophyta (*incertae sedis*)** – červené plastidy obsahující chlorofyl *a* a *c*<sub>2</sub> a biliproteiny, obalené čtyřmi membránami, s nukleomorfem mezi druhou a třetí membránou (Gantt *et al.* 1971; Apt *et al.* 1995; Moore *et al.* 2009; Baurain *et al.* 2010; Dorrel *et al.* 2011)
- Dosud nedokončenou sekundární endosymbiózu lze pozorovat mezi protistem *Hatena arenicola* (**Katablepharida (*incertae sedis*)**, sesterská skupina Cryptophyta) a zelenou řasou *Nephroselmis* (Okamoto *et al.* 2006, Yamaguchi *et al.* 2014).

### 2.2.3 Evoluce vyšších plastidů a počet endosymbiotických událostí

V současnosti stále není jasné, kolikrát v evoluci proběhlo získání plastidu endosymbiózou a kolikrát naopak jeho ztráta. Původní představy Cavaliera-Smithe se snažily v souladu s metodou maximální parsimonie uvažovat co nejmenší počet jeho získání za cenu předpokládání velkého množství jeho ztrát, neboť tyto jsou, co do potřebných adaptací molekulárních mechanismů, nesrovnatelně jednodušší než ustálení nového plastidu. Takto vznikla hypotéza Cabozoa, která považovala zelené plastidy euglenophyt a chlorarachniophyt za monofyletické, a hypotéza Chromalveolata, jež připisovala společný původ všem červeným plastidům zástupců této skupiny (Cavalier-Smith 1999, 2000, 2002; Keeling 2009).

V současnosti je téměř jisté, že endosymbiotických událostí, které daly vzniknout plastidům, bylo více, jejich determinace je však značně komplikovaná. U množství organismů s červeným plastidem se například setkáváme i s geny prokazatelně chlorophytního původu, přičemž není jasné, zda jde o doklad toho, že tyto organismy měly původně plastid zelený, který byl později ztracen a nahrazen, nebo pouze o důsledek všudypřítomného horizontálního genového transferu (Keeling 2009; Dorrel *et al.* 2011). Hypotéza Cabozoa již byla prokazatelně vyvrácena, podrobnější molekulárně fylogenetické analýzy jasně ukazují na odlišný původ plastidu euglenophyt a chlorarachniophyt (Rogers *et al.* 2007; Takahashi *et al.* 2007; Archibald 2009). Chromalveolární hypotéza je v současnosti rovněž prakticky překonána. Ve fylogenetických rekonstrukcích se říše Chromalveolata začala záhy rozpadat na dvě významně vzdálené větve: jednu tvořenou skupinami Alveolata a Stramenopila, blíže příbuznými a sesterskými k Rhizaria (dnešní klád SAR), a druhou tvořenou skupinami Cryptophyta a Haptophyta, původně považovanými za monofyletické a označované jako Hacrobia (Rice *et al.* 2006; Keeling 2009, Okamoto *et al.* 2009). Společný původ Cryptophyta a Haptophyta však byl zpochybněn a momentálně se jako nejpravděpodobnější jeví existence minimálně tří nezávislých získání plastidu v rámci zástupců bývalé skupiny Chromalveolata (Baurain *et al.* 2010; Burki *et al.* 2012).

Samostatnou kapitolou jsou obrněnky (Dinoflagellata), u nichž vedle původního peridinového plastidu existuje ještě několik typů plastidů různých původů, z nichž některé mohly povstat endosymbiózou terciární či dokonce kvartérní (Yoon *et al.* 2005; Baurain *et al.* 2010; Dorrel *et al.* 2011).

## 2.3 Struktura plastidů

Primární plastidy jsou obaleny dvěma membránami, které jsou homologické s membránami jejich cyanobakteriálního předka. Peptidoglykanová buněčná stěna u většiny zanikla, ve zredukované formě je zachována pouze u Glaucophyta, bazální linie říše Archaeplastida (Raven 2003). Dalším typem po cyanobakterii zděděné membrány jsou thylakoidy, které jsou u Glaucophyta a Rhodophyta jednoduché a obsahují chlorofyl *a* a biliproteiny, zatímco u Viridiplantae obsahují chlorofyl *a* a *b* a u vyšších rostlin a některých zelených řas tvoří grana, vrstvené shluky. Membrány thylakoidů obsahují světlosběrné komplexy tvořené proteinovými podjednotkami a fotosyntetickými pigmenty a jsou dějištěm světelné fáze fotosyntézy. Protonový gradient vzniká mezi jejich lumen a stromatem plastidu. Temnostní fáze probíhá ve stromatu.

Sekundární a vícenásobné plastidy jsou obaleny třemi až čtyřmi membránami. Předpokládá se, že vnitřní dvě jsou rovněž homologické s membránami cyanobakterie. Vnější membrána je často prokazatelně odvozena od endomembránového systému hostitele, jedná se o přeměněný pozůstatek fagozomu, v němž byl eukaryotní endosymbiont uložen po požití hostitelem. Někdy je označována jako membrána perialgální. Je funkčně a strukturně příbuzná endoplasmatickému retikulu, s nímž je u některých skupin (Cryptophyta, Haptophyta, Stramenopila) přímo fyzicky propojena: plastid vlastně leží v lumen RER. V tomto případě se vnější plastidová membrána někdy označuje jako CER (Chloroplast ER). Poslední z obalových membrán je periplastidální membrána homologická s cytoplasmatickou membránou eukaryotního endosymbionta (Cavalier-Smith 2000; Keeling 2009). U některých skupin (Euglenophyta, Dinoflagellata s peridinovým plastidem a některá Apicomplexa) došlo k sekundární ztrátě jedné z těchto čtyř membrán, přičemž dosud nelze s jistotou tvrdit které.

## 2.4 Transport proteinů do plastidu

### 2.4.1 Transport proteinů do semiautonomních organel

Ačkoli si semiautonomní organely, mitochondrie a plastidy, uchovávají část vlastního genomu a translační aparát, naprostá většina genů nezbytných pro jejich biogenezi a funkci

byla přesunuta do jádra buňky a jejich produkty je nutné do organel transportovat. Organelární transport proteinů je složitý proces, jehož se účastní velké množství molekul.

Nezbytnými součástmi mašinerie obecně vzato jsou:

- adresová oblast přítomná v nově nasyntetizovaném proteinu
- receptor na povrchu cílové organely, který tuto adresu rozeznává
- membránový kanál, kterým protein prochází přes membránu
- chaperony, které zajišťují to, aby byl protein transportován nesbalený a nativní konformaci zaujal až v cílové organelle
- peptidáza, která z úspěšně transportovaného proteinu odstraňuje adresu (pokud tato není součástí jeho maturované formy)

Transport proteinů do mitochondrie a primárního plastidu probíhá dosti podobným, avšak ne homologickým mechanismem a za přispění podobných molekul, z nichž některé byly odvozeny od sekrečního systému bakteriálních předků těchto organel (konkrétně porinu vnější membrány, Omp85), nicméně většina je eukaryotními inovacemi (Reumann *et* Keegstra 1999; Jarvis *et* Soll 2001; Jarvis *et* Robinson 2004; Vothknecht *et* Soll 2005).

---

#### 2.4.2 Transport proteinů do primárních plastidů

Transport probíhá posttranslačně. Protein je transportován ve formě nefunkčního a nesbaleného preproteinu vybaveného N-terminální adresovou doménou, tranzitním peptidem. Jedná se o úsek poměrně variabilní délky (20-100 aa) bohatý na hydroxylované aminokyseliny a obzvláště na svém N-konci kladně nabitý. Tranzitní peptid je definován právě těmito charakteristikami, nikoli na sekvenční úrovni. V navedení preproteinu od ribozómu k plastidu a jeho udržování v nesbaleném stavu hrají hlavní roli především chaperony Hsp70 a 90.

Samotný import přes dvě plastidové membrány zajišťují komplexy TOC a TIC (Translocon of outer/inner chloroplast membrane), jejich mitochondriální analogií jsou komplexy TOM a TIM. Skládají se z množství proteinových podjednotek s různými funkcemi: hlavní tvoří samotné kanály a fungují jako receptory, jiné podporují skládání a stabilizaci komplexů,

některé vykazují chaperonovou aktivitu (Jarvis *et* Soll 2001; Jarvis *et* Robinson 2004; Shi *et* Theg 2013).

Komplex TOC zajišťuje transport proteinů přes vnější plastidovou membránu, který je regulován membránovým potenciálem a probíhá za spotřeby energie ve formě GTP. Skládá se z následujících podjednotek:

**Toc75** – protein  $\beta$ -barelické struktury tvořící membránový kanál, odvozený od bakteriálního porinu Omp85 a patřící do stejnojmenné proteinové rodiny

**Toc34** – hlavní receptor rozeznávající preproteiny s tranzitním peptidem a podílející se na koordinaci skládání komplexu, náleží do třídy „translation-factor-related“ GTPáz

**Toc159** – „translation-factor-related“ GTPáza, podjednotka vlastnostmi a funkcí blízká Toc34, přesná povaha jejich spolupráce není objasněna

**Toc64** – pravděpodobně neesenciální podjednotka obsahující motiv TPR (tetratricopeptide repeat) rozeznávající preproteiny navázané na Hsp90 na cytosolické straně a zároveň v mezimembránovém prostoru komunikující s komplexem TIC skrze Hsp70

**Toc12** – podjednotka úzce spolupracující s Toc64

(Hofmann *et* Theg 2005; Oreb *et al.* 2007; Schleiff *et* Becker 2011; Shi *et* Theg 2013)

Mimo komplex TOC stojí protein **OEP80** (v některé literatuře označovaný i Toc75-V), porin vnější membrány příbuzný Toc75. Je esenciální, ale jeho přesná funkce zatím není objasněna. Je možné, že transportuje některé preproteiny nezávisle na Toc75 nebo je zodpovědný za vkládání proteinů do vnější membrány podobně jako mitochondriální SAM50 (Schleiff *et* Becker 2011, Hsu *et al.* 2012).

Komplex TIC zajišťuje transport preproteinů přes vnitřní membránu a jejich úpravy a sbalování ve stromatu za spotřeby energie ve formě ATP. Skládá se z následujících podjednotek:

**Tic110** – pravděpodobně hlavní podjednotka tvořící kanál a na stromální straně organizující úpravy proteinu po transportu ve spolupráci s Tic40

**Tic20** – nezávislý kanál, možná pro odlišný typ proteinů než Tic110

**Tic21** – další potenciální podjednotka tvořící kanál

**Tic40** – podjednotka interagující s chaperony Hsp70, 93 a 100 a zprostředkovávající sbalování proteinu na stromální straně

**Tic22** – podjednotka směřující do mezimembránového prostoru, komunikující skrze Hsp70 s komplexem TOC

**Tic32** – hlavní regulační podjednotka příbuzná „short-chain“ dehydrogenázám, reaguje na koncentraci kalmodulinu a NADPH, které odrážejí redoxní poměry v plastidu

**Tic55** – železosirný protein, spolu s Tic32 se účastní regulace transportu

**Tic62** – podjednotka vázající NAD a FNR (ferredoxin-NADP-oxidoreduktázu), rovněž se podílejší na regulaci

(Oreb *et al.* 2007; Benz *et al.* 2009; Stengel *et al.* 2009; Kovács-Bogdán *et al.* 2011; Schleiff *et al.* 2011; Shi *et al.* 2013; Tsai *et al.* 2013)

Komplexy na sebe funkčně i prostorově přímo navazují, mezimembránový prostor je mezi nimi zúžený a preproteiny jsou předávány z jednoho na druhý přímo v průběhu transportu - preprotein může pokračovat skrz vnitřní membránu, zatímco jeho C-konec ještě prochází membránou vnější. Ve stromatu dochází k odštěpení tranzitního peptidu enzymem SPP (stromal processing peptidase) a protein buď zaujímá nativní konformaci, nebo je dále transportován do membrány nebo lumen thylakoidů na základě vnitřního signálu či další N-terminální adresové domény umístěné za tranzitním peptidem.

Existuje několik paralelních cest, jimiž se různé proteiny dostávají do thylakoidů:

- systém **Sec** importující za spotřeby ATP několik proteinů do lumen thylakoidů na základě N-terminálního adresového peptidu, který je následně odštěpen
- systém **Tat** (Twin-arginine translocation) rovněž importující proteiny do lumen a rozeznávající odštěpitelný N-terminální signál, avšak fungující bez spotřeby ATP či GTP, pouze s využitím gradientu pH
- systém závislý na **SRP** (Signal recognition particle), která rozeznává proteiny s vnitřním signálem a napomáhá jejich vkládání do membrány thylakoidů



- spontánní vkládání proteinů do membrány thylakoidů (Cline *et al.* 1993, Jarvis *et Robinson* 2004, Vothknecht *et Soll* 2005)

Popsaný mechanismus zprostředkovaný komplexy TOC a TIC a závislý na přítomnosti tranzitního peptidu platí za hlavní dráhu transportující do plastidů naprostou většinu proteinů. Existují však výjimky, proteiny používající pro vstup do plastidu alternativní cesty. Některé proteiny vnější membrány, včetně podjednotek samotného komplexu TOC, jsou do membrány vkládány spontánně na základě vnitřního signálu (Stengel *et al.* 2007) a několik proteinů je do stromatu a vnitřní membrány transportováno i přes nepřítomnost TP (Miras *et al.* 2002; Nada *et Soll* 2004). Zajímavou nekanonickou cestu podniká protein CAH1, který je namísto TP vybaven signálním peptidem a postupuje po části sekreční dráhy, přes ER a Golgi ve vácích, které splývají s vnější plastidovou membránou, čímž se protein ocitá v mezimembránovém prostoru (Radhamony *et Theg* 2006).

---

#### 2.4.3 Transport proteinů do sekundárních a vyšších plastidů

Vyšší počet obalových membrán, přes něž je třeba transportovat jaderně kódované plastidové proteiny, je zásadním rozdílem oproti primárním plastidům. Pozoruhodné je, že i zcela nepříbuzné skupiny organismů se sekundárními plastidy různých původů se s touto inovací vyrovnaly podobným způsobem. Jedná se o příklad evoluční konvergence: transportní mechanismy reflektují obecné zákonitosti související s přítomnými organelami a molekulami, nikoli jejich společný původ (Chaal *et Green* 2005; Bolte *et al.* 2009; Agrawal *et Striepen* 2010).

Transport přes vnitřní dvě, původně cyanobakteriální, membrány je u protist se sekundárními a vyššími plastidy obecně méně probádán než transport přes membrány přídatné. Z dostupných poznatků však poměrně zřejmě vyvstává model, podle něž probíhá tento proces obdobně jako u primárních plastidů a zprostředkovávají jej homology systémů TOC a TIC. Alespoň některé podjednotky komplexu TIC byly identifikovány u většiny skupin (s výjimkou Euglenophyta), podjednotky TOC zatím pouze u Chlorarachniophyta a Apicomplexa (Douglas *et al.* 2001; McFadden *et van Dooren* 2004; Waller *et McFadden* 2005; Gilson, Su *et al.* 2006; van Dooren *et al.* 2008; Hirakawa *et al.* 2012), možný vzdálený homolog Toc75 pak i u Heterokontophyta (Bullmann *et al.* 2010). Je možné, že u některých

skupin došlo k nahrazení systému TOC/TIC jinou mašinerií zapojující odlišné molekuly (Tonkin *et al.* 2006; Agrawal *et al.* 2010).

Plastidové preproteiny obsahují tranzitní peptid nezbytný pro jejich správný import. Ten má poměrně variabilní délku, avšak zachovává si typické vlastnosti, tedy kladný náboj a vysoký počet hydroxylovaných reziduí (Durnford *et al.* 2006; Gould *et al.* 2007; Patron *et al.* 2007; Gile *et al.* 2008; Felsner *et al.* 2010), pouze u skupiny Apicomplexa se jeho charakteristiky výrazněji odchyľují (Karnataki *et al.* 2007; DeRocher *et al.* 2008).

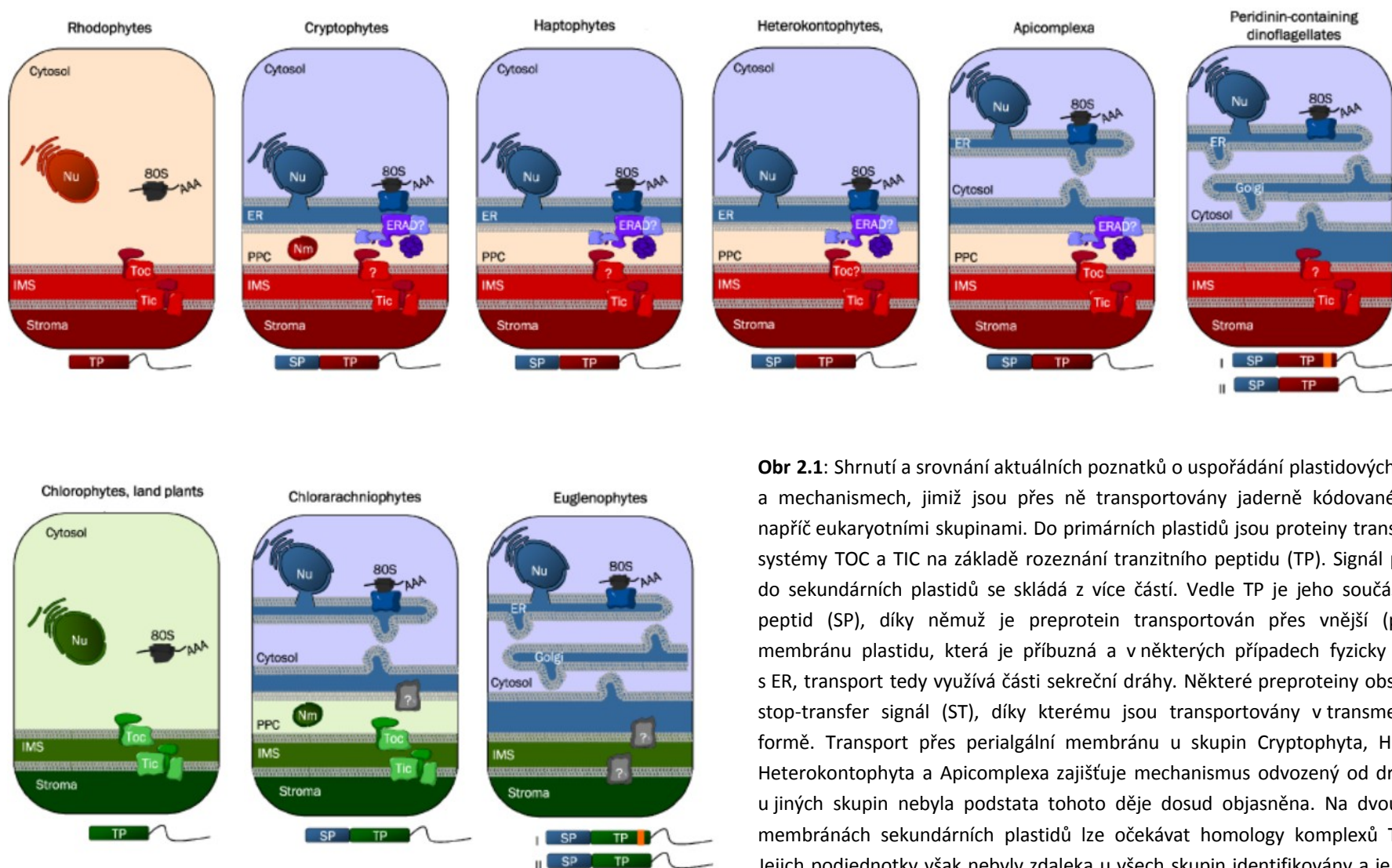
Vnější membrána sekundárních či vícenásobných plastidů je odvozena od endomembránového systému hostitelské buňky. U skupin Heterokontophyta, Cryptophyta a Haptophyta je přímo kontinuální s ER a jsou na ní navázány ribozómy. Transport proteinů do plastidu tedy začíná podobně jako sekreční dráha (Wastl *et al.* 2000; Nassoury *et al.* 2005; Bolte *et al.* 2009; Agrawal *et al.* 2010). Plastidové preproteiny jsou na N-konci vybaveny klasickým signálním peptidem, krátkou (do 30 aa) hydrofobní oblastí, která se nachází ještě před TP. Signální peptid je rozeznán SRP ihned po svém přeložení a preprotein je i s ribozomem kotranslačně transportován k translokonu Sec61, jímž prochází do lumen buď celý, nebo částečně, přičemž zůstává integrován v membráně prostřednictvím hydrofobní stop-transfer domény umístěné za TP (Nassoury *et al.* 2005; Rapoport 2008). V případě výše zmíněných plastidů ležících v lumen ER se takto ocitá v prostoru mezi vnější a periplastidální membránou. V případě plastidů oddělených od ER se k vnější membráně dostává ve vezikulech postupujících v některých případech přes Golgi (Euglenophyta, Dinoflagellata s peridinovým plastidem) (Sulli *et al.* 1999; Nassoury *et al.* 2003; Sláviková, Vacula *et al.* 2005; Patron *et al.* 2005), v jiných přímo (Chlorarachniophyta; situace u Apicomplexa není zatím objasněna) (Hirakawa *et al.* 2009). V úvahu připadá i paralelní využívání těchto drah jednou skupinou pro různé třídy preproteinů (Karnataki *et al.* 2007; DeRocher *et al.* 2008; Tonkin *et al.* 2006).

Za transport přes periplastidální membránu zodpovídá u skupin Apicomplexa, Heterokontophyta, Cryptophyta a Haptophyta systém vzniklý duplikací některých komponent dráhy ERAD (ER-associated degradation) přítomné na RER a sloužící k rozeznání, ubikvitinaci a degradaci špatně složených sekretovaných proteinů. Tento transportní systém se někdy označuje SELMA (Symbiont-specific ERAD-like Machinery). Hlavní kanál, jímž

preproteiny prochází, tvoří paralog proteinu Der1 (Agrawal *et al.* 2009; Spork *et al.* 2009; Hempel *et al.* 2009, 2010).

Transport do sekundárních plastidů tedy probíhá v několika navazujících krocích. Signál, který umožňuje navedení preproteinu až do místa určení, tedy musí mít několik částí. Na každou reaguje jiná část transportní mašinerie a to zpravidla až po odstranění té předcházející. Základním a nejběžnějším stavem je přítomnost bipartitního signálu složeného ze signálního a tranzitního peptidu. Signální peptid je odštěpen v ER signální peptidázou, čímž dochází k odhalení TP nezbytného pro průchod vnitřními dvěma membránami. Tranzitní peptid je odštěpen ve stromatu plastidu SPP (Apt 2002; Agrawal *et al.* 2010). Signál však může mít i více částí. U proteinů směřujících do lumen thylakoidů drahami Sec či Tat se za TP nachází ještě LTD (lumen-targeting domain). U některých preproteinů euglenophyt a obrněnek s peridinovým plastidem je za TP a před případným LTD přítomna ještě hydrofobní stop-transfer (ST) doména, která má charakter transmembránového helixu, jímž je protein dočasně ukotven v membráně ER a následně od něj odděleného váčku směřujícího k plastidu (Bolte *et al.* 2009; Agrawal *et al.* 2010).

V této kapitole popsanou situaci shrnuje schéma na následující straně (obr. 2.1).



**Obr 2.1:** Shrnutí a srovnání aktuálních poznatků o uspořádání plastidových membrán a mechanismech, jimiž jsou přes ně transportovány jaderně kódované proteiny, napříč eukaryotními skupinami. Do primárních plastidů jsou proteiny transportovány systémy TOC a TIC na základě rozeznání tranzitního peptidu (TP). Signál pro import do sekundárních plastidů se skládá z více částí. Vedle TP je jeho součástí signální peptid (SP), díky němuž je preprotein transportován přes vnější (perialgální) membránu plastidu, která je příbuzná a v některých případech fyzicky propojená s ER, transport tedy využívá části sekreční dráhy. Některé preproteiny obsahují ještě stop-transfer signál (ST), díky kterému jsou transportovány v transmembránové formě. Transport přes perialgální membránu u skupin Cryptophyta, Haptophyta, Heterokontophyta a Apicomplexa zajišťuje mechanismus odvozený od dráhy ERAD, u jiných skupin nebyla podstata tohoto děje dosud objasněna. Na dvou vnitřních membránách sekundárních plastidů lze očekávat homology komplexů TOC a TIC. Jejich podjednotky však nebyly zdaleka u všech skupin identifikovány a je možné, že jejich funkci převzaly jiné systémy (převzato a upraveno z Bolte *et al.* 2009).

## 2.5 Euglenophyta

### 2.5.1 Obecná charakteristika skupiny

Euglenophyta je podskupina rozmanité třídy Euglenoidea (kmen Euglenozoa, říše Excavata) vymezená fototrofií a přítomností funkčního zeleného plastidu (s výjimkou několika bezbarvých zástupců jako např. *Euglena longa*, kteří schopnost fotosyntézy a příslušné pigmenty ztratili a vyživují se sekundární osmotrofií). Tato skupina je v současnosti považována za monofyletickou, její kořen určuje jediná endosymbiotická událost (Gibbs 1981). Při ní společný předek těchto organismů získal plastid pohlcením chlorophytnej řasy, jejímž nejbližším známým příbuzným je rod *Pyramimonas* (Turmel *et al.* 2009).

Euglenoidea nemají pro mnoho členů říše Excavata typickou ventrální rýhu, pouze periflagelární kapsu skládající se z pevného, mikrotubuly vyztuženého kanálku, a pružného rezervoáru. V jeho blízkosti se u většiny sladkovodních a některých mořských zástupců nachází kontraktilní vakuola sloužící k odstraňování přebytku vody, kterou do něj vypouští.

Periflagelární kapsou prochází bičíky. Ty jsou obvykle dva, nicméně u většiny zástupců je patrný pouze jeden, zatímco druhý, výrazně kratší, nepřesahuje okraj kapsy. Hlavní bičík směřuje vpřed a má pohybovou funkci. Druhý je, pokud vystupuje, většinou vlečný a slouží k zachytávání potravy či přichycení k podkladu. Bičíky mají klasickou strukturu axonemy  $9 \times 2 + 2$  mikrotubuly a vyztužuje je paraflagelární lišta či tyčinka, cytoskeletární útvar tvořený sítí mikrofilament umístěný podélně s jejich osou. Díky tomu jsou často mohutné a jejich tloušťka dosahuje až pětinasobku tloušťky běžného bičíku. Hlavní bičík je navíc kryt množstvím unilaterálně uspořádaných vláskovitých mastigonemat, která usnadňují pohyb (Leedale 1967; Hyams 1982; Hausmann *et* Hülsmann 1996).

Buňka je kryta pelikulou proteinové povahy krytou cytoplasmatickou membránou. Pelikula se skládá z pásů fibril tvořících hřebeny a zářezy a zapadajících do sebe principem „střešních tašek“ (Joachim *et* Sommer 1965; Leander *et* Farmer 2000). Takovéto spojení je někdy pohyblivé a zaručuje buňce pružnost a možnost do určité míry měnit tvar. Pod pelikulou se po celém povrchu buňky nacházejí subpelikulární (kortikální) mikrotubuly a váčky obsahující sliz, který je vylučován na povrch buňky jakožto ochranná vrstva nebo obal cyst či spojovací materiál kolonií (palmel) u některých druhů, které tyto tvoří. Pelikula a na ni navazující

cytoskeletární struktury mají helikální (šroubovitou) symetrii (Leedale 1967; Leander *et Farmer* 2001).

Euglenophyta se pohybují především plaváním pomocí hlavního bičíku. Tento pohyb je poměrně rychlý a buňka se při něm otáčí kolem své podélné osy. Mnozí zástupci jsou však schopni ještě alternativního způsobu lokomoce zvaného metabolie. Jde o pro euglenidy typický přelévavý pohyb, při němž se buňka posunuje vpřed pomocí smršťování a natahování. Míra, do jaké jsou buňky schopny měnit tvar a jak ochotně to provádějí, se různí. Některé rody s rigidní pelikulou (*Phacus*, *Lepocinclis*) či extracelulární schránkou (*Trachelomonas*) či žijící přisedle (*Colacium*) jsou metabolie neschopné (Leedale 1967; Wolowski *et Hindák* 2005).

Jádro euglenophyt je ovoidní a obsahuje chromozomy, které zůstávají během celého buněčného cyklu kondenzovány. Mitóza je uzavřená, jejím netypickým znakem je uspořádání chromatid v metafázi rovnoběžně s dělicím vřeténkem (Leedale 1967). Pozoruhodným znakem genomu euglenidů je vysoký obsah a velké množství typů intronů, včetně unikátních intronů třídy III a tzv. twintronů (intronů vložených do intronů) (Doetsch *et al.* 2001). Vedle *cis*-splicingu u nich ve velké míře probíhá i *trans*-splicing, jímž je na 5'-konec většiny cytoplasmatických i plastidových mRNA připojována nepřekládaná leader sekvence pocházející z sRNA (Tessier *et al.* 1991; Kuo *et al.* 2013).

Endoplasmatické retikulum je strukturně i funkčně rozděleno na část tubulární (odpovídající přibližně SER) a vezikulární (RER). Golgiho aparát je vyvinutý a blízce asociovaný s ER (Leedale 1967; Hausmann *et Hülsmann* 1996).

Nápadným a typickým znakem euglenophyt je přítomnost červeně zbarvené světločivné skvrny, díky níž může buňka fototakticky reagovat na světlo, a to jak pozitivně (orientovaný pohyb ze tmy za světlem), tak negativně (únik před příliš silným zářením do oblasti osvětlené mírněji). Světločivnou skvrnu tvoří stigma, membránová organela obsahující karotenoidová granula, jež byla nejspíše odvozena od plastidu stejně jako u chlorophytů řasy *Chlamydomonas* (Dieckmann 2003), a s ní asociovaná ztlustělinina na bázi hlavního bičíku označovaná jako paraflagelární tělísko. Tyto dvě struktury se nacházejí v rovině kolmé na osu buňky. Při pohybu stigma rotuje kolem paraflagelárního tělíska a střídavě ho zastiňuje, což umožňuje orientaci fototaxe. Centrálním enzymem tohoto děje je fotoreaktivní adenylát

cykláza tvořící po excitaci modrou složkou slunečního záření cAMP, na tento signál přímo reaguje pohybový bičík (James *et al.* 1992, Iseki *et al.* 2002).

Zatímco vyšší rostliny a zelené řasy používají jako zásobní polysacharidy  $\alpha$ 1-4 glukany, u ostatních řas a fotosyntetických protist jsou přítomny  $\beta$ 1-3 glukany. U Euglenophyta je to pro tuto skupinu unikátní paramylon. Ten je syntetizován v plastidech a skladován ve formě škrobových čepiček pyrenoidů i zrn uložených ve shlucích v cytoplasmě. Tato zrna nabývají u různých zástupců různých tvarů a velikostí a mohou sloužit jako taxonomický znak (Monfils *et al.* 2011). Vedle paramylonu používají Euglenophyta k ukládání energie lipidy uložené ve váčcích obsahujících i karotenoidy. Ve starých buňkách dochází k nahromadění těchto váčků, což způsobuje jejich hnědé zbarvení (Leedale 1967).

Euglenophyta mají ve své buňce jedinou retikulární mitochondrii, jejíž výběžky zasahují do celé cytoplasmy a nahuštěné jsou zejména pod cytoplasmatickou membránou. Jedná se o dynamickou organelu, jejíž struktura se mění v průběhu buněčného cyklu, v určitých fázích se dokonce částečně rozpadá a oddělují se od ní diskrétní váčky (Osafune 1973; Hayashi *et al.* 1989). Kristy jsou diskoidální. Jako energetický substrát Euglenophyta upřednostňují acetát a etanol před glukózou (Leedale 1967). Metabolismus mitochondrie má standardní průběh, vstupy a výstupy, avšak některé jeho charakteristiky jsou zvláštní. Celkově lze říci, že morfologie i fyziologie mitochondrie euglenophyt je atypická, což je v souladu s její příslušností k říši Excavata, v rámci níž se často setkáváme se zvláštními mitochondriemi: u řady jejích podskupin a zástupců mají tyto značně pozměněnou či zredukovanou morfologii i funkci (hydrogenosom trichomonád, mitosom giardie, dosud málo prozkoumané, ale s jistotou velmi redukováné, či dokonce sekundárně zcela ztracené „mitochondrion-like“ organely oxymonád (Hampl *et al.* 2008; Zubáčová *et al.* 2013)). Celá skupina Euglenozoa je známa velmi neobvyklými vlastnostmi svých mitochondriálních genomů. Velikost a struktura jejich mitochondriálního genomu a molekulárně-genetické mechanismy s ním související mají různorodé zvláštní charakteristiky, které se zdají mít původ v přítomnosti genových fragmentů u jejich společného předka a které se patrně vyvinuly cestou konstruktivní neutrální evoluce, nezřídka do takzvané "nevyléčitelné complexity" (Flegontov *et al.* 2011; Lukeš *et al.* 2011). Nejklasičtějším příkladem je složitá organizace mtDNA (kinetoplastu) u Kinetoplastida a její extrémně komplikovaný editing. U euglenidů je mtDNA složena z množství lineárních molekul různé velikosti, které obsahují jak kompletní geny, tak sekvenčně prakticky shodné fragmenty jejich duplikovaných verzí a množství repetice, často

uspořádaných do shluků (Roy *et al.* 2007; Lukeš *et al.* 2011). Z této skutečnosti patrně vychází další unikátní rys společný mitochondriím skupin Euglenophyta a Kinetoplastida a to výrazně vyšší počet proteinových podjednotek jednotlivých komplexů dýchacího řetězce než u „konvenční“ mitochondrie, např. jedenáct podjednotek komplexu I namísto čtyř. Jedná se z většiny o paralogy vzniklé genovou duplikací (Perez *et al.* 2014).

---

### 2.5.2 Plastid

Plastidy skupiny Euglenophyta jsou trávově zelené a obsahují chlorofyly *a* a *b*,  $\beta$ -karoten, antheraxantin, neoxantin a další karotenoidy. Na jednu buňku jich připadá počet v řádu jednotek až desítek, který není fixní (např. u modelového druhu *Euglena gracilis* je to 6–12). Jejich dělení může a nemusí být synchronizováno s dělením buňky, to závisí patrně právě na jejich počtu. U různých druhů se setkáváme s různými morfologiemi plastidů od kulovitých, přes ploché různých tvarů po členité. Thylakoidy jsou uspořádány v lamelách, většinou po třech. Pyrenoid je většinou přítomen, obvykle ve formě čepičky tvaru hodinového skla (Leedale 1967; Hausmann *et al.* 1996).

Základní odlišností od klasického rostlinného plastidu je přítomnost tří obalových membrán namísto dvou. Vzhledem k tomu, že jejich proteinové složení dosud není příliš důkladně prozkoumáno, nelze činit definitivní závěry ohledně jejich evolučního původu a není tedy jisté, která ze čtyř původních membrán byla ztracena. Obecně se soudí, že ztráta jedné z vnitřních, napříč eukaryotní doménou silně konzervovaných membrán cyanobakteriálního původu, je velmi nepravděpodobná. Vzhledem k pozoruhodným evolučním konvergencím u signálních domén plastidových proteinů euglenophyt a obrněnek s peridinovým plastidem lze očekávat stejný původ jejich plastidových membrán, nelze však s jistotou určit, zda onou ztracenou membránou byla membrána periplastidální (homologická s cytoplasmatickou membránou eukaryotního endosymbionta) či perialgální (homologická s ER hostitele) (Agrawal *et al.* 2010).

Plastidy euglenophyt nejsou esenciální. Ve skupině Euglenoidea je vývojově původní fagotrofie (bakteriovorie či eukaryovorie), schopnost fotosyntézy je odvozená a Euglenophyta jsou schopni v určitých podmínkách používat i alternativní způsoby získávání energie (Leander 2004). Za evolučně zajímavý organismus demonstrující přechod mezi fagotrofními



a fototrofními euglenidy platí *Rapaza viridis* vyživující se mixotrofií (Yamaguchi *et al.* 2012). Syntéza chlorofylu je závislá na světle a u organismů dlouhodobě kultivovaných ve tmě či ošetřených antibiotiky dochází k dočasnému vybělení plastidu a ztrátě schopnosti fotosyntézy, buňky však přežívají a dělí se díky přechodu na „záložní zdroj“, osmotrofii (Leedale 1967; Miyoshi *et Tsubo* 1968). Není tedy překvapující, že uvnitř skupiny Euglenophyta několikrát došlo ke ztrátě schopnosti fotosyntézy a náleží do ní množství sekundárně osmotrofních druhů, ve kterých je však zachován bezbarvý plastid (například *Euglena longa* a *quartana*, dříve považované za samostatné rody *Astasia* a *Khawkinea*, a tři druhy rodu *Phacus* dříve řazené do rodu *Hyalophacus* (Wolowski *et Hindák* 2005)).

---

### 2.5.3 Transport proteinů do plastidu

U euglenophyt se setkáváme se třemi třídami preproteinů lišících se délkou a uspořádáním signální domény:

- Preproteiny třídy I obsahují signální peptid a tranzitní peptid, za nimiž následuje ještě stop-transfer signál, díky němuž jsou ve vakuu odděleném od ER transportovány ve formě transmembránového proteinu (Sulli *et al.* 1999). Jejich cílovou lokalizací je stroma či membrána thylakoidů.
- Preproteiny třídy Ib mají signální doménu uspořádanou stejně jako preproteiny třídy I, ale za ST se u nich nachází ještě LTD. Jejich cílovou lokalizací je lumen thylakoidů
- Preproteiny třídy II obsahují pouze signální a tranzitní peptid. Jejich cílovou lokalizací je stroma či membrána thylakoidů (Durnford *et Gray* 2006).

Signální peptid je u euglenophyt  $33 \pm 9$  aa dlouhý a silně hydrofobní (Sulli *et al.* 1999; Durnford *et Gray* 2006). Na základě sekvence je predikčními programy považován za transmembránový helix. Podobné vlastnosti má stop-transfer doména nacházející se 52-68 aa za koncem SP a dosahující délky 45-98 aa (Durnford *et Gray* 2006). Tranzitní peptid následující za SP má kladný náboj, poměrně variabilní délku a je pro něj typický zvýšený obsah hydroxylovaných aminokyselin (více než 15 %) a alaninu (Patron *et Waller* 2007).

V prvním kroku transportu je protein kotranslačně importován do ER na základě rozeznání signálního peptidu SRP. Preproteiny třídy II procházejí do lumen, zatímco preproteiny tříd I a Ib zůstávají hydrofobním ST integrovány v membráně (Sulli *et al.* 1999; Nassoury *et al.*

2003; Nassoury *et al.* Morse 2005). Signální peptid je odstřižen signální peptidázou přítomnou v lumen ER. Transport pokračuje prostřednictvím váčků pučících z ER a postupujících přes Golgi až k vnější membráně plastidu, s níž splývají. Tím se preproteiny třídy I a Ib dostávají do vnější membrány a preproteiny třídy II do prostoru mezi vnější a prostřední membránou (Durnford *et al.* Gray 2005; Agrawal *et al.* Striepen 2010). Tento proces byl pozorován a zkoumán; jeho molekulární podstata, způsob, jakým jsou váčky cílovou membránou rozeznány a splývají s ní, však dosud není známa. Bylo dokázáno, že v tomto ději patrně nehrají roli proteiny SNARE, neboť nereagoval na činidla, která funkci těchto proteinů brání (Sláviková, Vacula *et al.* 2005). Způsob, jakým preproteiny překonávají vnitřní dvě membrány, zůstává dosud záhadou. Jedná se o mechanismus závislý na rozeznání TP, neboť jeho přítomnost je pro transport proteinu nezbytná (Durnford *et al.* Gray 2005) a je možné, že jej zajišťují homology alespoň některých komponent komplexů TOC a TIC, žádné však dosud nebyly v dostupných datech identifikovány (Inagaki *et al.* 2000).

### 3 CÍLE PRÁCE

- Vyvinout a optimalizovat metodu pro izolaci plastidů fototrofních euglenidů a připravit vzorek proteinů z plastidové membránové frakce *E. gracilis*.
- Zanalyzovat tento proteinový vzorek hmotnostní spektrometrií a provést anotaci získaných dat se zaměřením na potenciální proteinové transportéry.
- Izolovat a osekvenovat RNA *E. gracilis* a připravit transkriptomickou databázi.
- Za použití bioinformatických metod hledat v transkriptomických datech z *E. gracilis* a *E. gymnastica* a proteomu membrán plastidu *E. gracilis* homology proteinů, které by mohly být zapojeny do protein-transportní mašinerie.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Původ a kultivace použitých organismů

#### 4.1.1 Původ zkoumaných organismů

Pro účely této práce bylo použito po jedné kultuře každého ze zkoumaných organismů. Axenická kultura *Euglena gracilis* kmene Z1 nám byla laskavě poskytnuta týmem prof. Juraje Krajčoviče z Ústavu buněčné biologie Univerzity Komenského v Bratislavě. Kultura *Eutreptiella gymnastica* kmene K-0333 není axenická, obsahuje bakterie a pochází ze sbírky kultur SCCAP (Scandinavian Culture Collection of Alga and Protozoa, <http://www.sccap.dk/>)

#### 4.1.2 Složení médií a způsob kultivace

Pro kultivaci *E. gracilis* bylo použito médium L25. Jedná se o jednoduché tekuté médium (tab. 4.1), které bylo HCl upraveno na pH 6–6,5 a následně sterilizováno v autoklávu. Linie *E. gracilis* byla dlouhodobě vedena v 15ml plastových zkumavkách s povoleným šroubovacím uzávěrem a přeočkovávána zhruba jedenkrát až dvakrát měsíčně. Materiál na jednotlivé experimenty byl pěstován nárazově ve velkém objemu (typicky 1 l) v 1l skleněných kultivačních lahvích, přičemž bylo do jedné lahve média naočkováno 5–10 ml dobře narostlé kultury. Zatímco dlouhodobá linie byla kultivována při pokojové teplotě a denním světle, materiál určený k experimentálnímu zpracování byl pěstován v boxu pro kultivaci fotosyntetických organismů při konstantní teplotě 17 °C a intenzivnějším umělém světle s pravidelným dvanáctihodinovým cyklem.

Pro kultivaci *E. gymnastica* bylo použito médium TL30. Médium je připraveno z 3% roztoku mořské soli a komerčních složek dodávaných SCCAP, půdního extraktu a roztoku vitamínů (tab. 4.1). Médium kvůli obsahu srážlivých solí nelze sterilizovat v autoklávu, pro sterilizaci bylo nutné jej přefiltrovat do sterilní nádoby přes 0,22μm filtr pomocí injekční stříkačky či vývěvy. Kultura byla dlouhodobě vedena v 15ml plastových zkumavkách v kultivačním boxu při teplotě 17 °C a přeočkovávána jedenkrát měsíčně. Kultura *E. gymnastica* roste podstatně

pomaleji a méně ochotně než *E. gracilis*, a to zvláště ve větších objemech, což je nutné zohlednit při přípravě většího množství buněk pro experimentální zpracování. Pro tento účel byla proto kultura očkována co největším objemem a pěstována paralelně v 8–12 50ml plastových zkumavkách, a to rovněž v kultivačním boxu.

**Tab. 4.1:** Složení kultivačních médií pro *E. gracilis* a *E. gymnastica*

<b>médium L25, pH = 6–6,5</b>	
destilovaná H <sub>2</sub> O	1000 ml
octan sodný	2 g
proteózový pepton (Oxoid)	1 g
<b>médium TL30, pH = 6–6,5</b>	
destilovaná H <sub>2</sub> O	1000 ml
mořská sůl	30 g
půdní extrakt (SCCAP)	6 ml
vitaminový roztok (SCCAP)	2 ml

## 4.2 Izolace plastidů a jejich membránové frakce

Plastidy byly z obou zkoumaných organismů izolovány stejným postupem podle následujícího protokolu vycházejícího především z metod používaných týmem prof. Juraje Krajčoviče z Ústavu buněčné biologie Univerzity Komenského v Bratislavě (Sláviková, Vacula *et al.* 2005; Mason *et al.* 2006; Krajčovič, osobní sdělení). V tabulce 4.2 je popsáno složení použitých pufrů a jiných roztoků.

**Tab. 4.2:** Složení roztoků použitých pro izolaci plastidů

<b>izolační pufr, pH = 5,5</b>	
destilovaná H <sub>2</sub> O	100 ml
sorbitol	6 g
HEPES	0,6 g
MgCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	0,2 g

0,5M EDTA, pH=8	200 µl
koktejl inhibitorů proteáz pro rostlinné buňky (Sigma)	150 µl
<b>pufr A</b>	
destilovaná H <sub>2</sub> O	5 ml
manitol	0,22 g
Tris	0,05 g
0,5M EDTA, pH=8	60 µl
<b>pufr B</b>	
destilovaná H <sub>2</sub> O	12 ml
manitol	0,53 g
Tris	0,02 g
0,5M EDTA, pH=8	24 µl
<b>zásobní roztok OptiPrep</b>	
komerční roztok OptiPrep	9,5 ml
pufr A	2 ml

#### 4.2.1 Izolace plastidů

Kultura v exponenciální fázi růstu byla centrifugována 10 min na 2 500 g v centrifuze Beckman J-26XPI, supernatant byl odebrán. Buněčný pelet byl následně resuspendován v izolačním pufru, převeden do 50ml plastové zkumavky a ještě jednou promyt centrifugací 5 min na 2 500 g. Ze sedimentovaných buněk byla následně ve 2ml kyvetě pro bead-beater připravena hustá suspenze v izolačním pufru, do níž byly přisypány kyselinou omyté skleněné kuličky (velikost 212–300 µm) tak, aby poměr objemů buněčné složky, pufru a kuliček byl přibližně 1:1:1. Buňky byly rozbíjeny v bead-beateru na nejnižší možný výkon (2 500 g), a to v opakovaných bězích po 5–10 sekundách mezi nimiž byl vzorek držen na ledu a průběžně kontrolován pod mikroskopem. Když byla většina buněk rozbitá a jejich obsah volně vylitý v médiu, byla směs převedena do 50ml plastové zkumavky, naředěna izolačním pufrem na objem 40–50 ml a přefiltrována přes zhruba 20 vrstev gázy. Tento krok slouží k odstranění skleněných kuliček a části velkých a lehkých pozůstatků rozbitých buněk. Získaná suspenze byla následně přefiltrována ještě přes polykarbonátovou membránu s 5µm póry, čímž byly

odstraněny nedokonale rozbité a nerozbité buňky a další případné větší částice. S filtrátem byly poté provedeny dva kroky zjednodušené diferenciální centrifugace. První běh 3 min na 400 g slouží k odstranění největších částí, které ještě prošly filtrací. Pelet byl odstraněn a supernatant centrifugován 8 min na 6 000 g. Získaný supernatant obsahující velmi lehké částice a váčky byl odstraněn a pelet složený z plastidů a dalších těžších objektů byl důkladně, avšak jemně, resuspendován ve 2 ml izolačního pufru. Tento vzorek byl nanesen na diskontinuální gradient připravený v kyvetě pro rotor SW-41 ze čtyř 2ml fází roztoku OptiPrep o koncentracích 15, 20, 25 a 30 % (tab. 4.3).

**Tab. 4.3:** Složky koncentračního gradientu OptiPrep

	zásobní roztok OptiPrep	pufr B
<b>30 % OptiPrep</b>	2,8 ml	1,87 ml
<b>25 % OptiPrep</b>	2,27 ml	2,4 ml
<b>20 % OptiPrep</b>	1, 87 ml	2,8 ml
<b>15 % OptiPrep</b>	1,47 ml	3,2 ml

Vzorek na gradientu byl centrifugován v ultracentrifuze Beckman L-90K na výklopném rotoru SW-41 po dobu 2 hodin na 30 000 otáček/min. Na rozhraní fází 20% a 25% OptiPrepu se takto vytvořil jasně odlišitelný, zeleně zbarvený pruh bohatý na plastidy. Světle zelené zbarvení ostatních frakcí bylo způsobeno uvolněním chlorofylu z poškozených plastidů. Plastidová frakce byla odebrána a několikrát promyta izolačním pufrem v 1,5ml zkumavce 5 min na 6 000 g. Z její menší části (přibližně čtvrtiny celkového množství) byl připraven kontrolní proteinový vzorek. Materiál byl rozředěn ve 20 µl vzorkového pufru (vizte tabulku 4.4, str. 34), s nímž byl povařen 10 min ve vodní lázni, aby došlo k denaturaci, rozvolnění jednotlivých proteinových řetězců a odstranění disulfidických vazeb redukcí. Ze zbytku získané frakce byly izolovány membrány, pro kontrolu případně zvlášť i solubilní proteiny ze stromatu a lumen thylakoidů.

---

#### 4.2.2 Izolace plastidových membrán

Plastidy byly rozděleny na dvě frakce, membránové proteiny a solubilní proteiny (obsah stromatu a lumen thylakoidů), metodou karbonátové extrakce (Fujiki *et al.* 1982). Vzorek izolovaných plastidů byl důkladně resuspendován v 8 ml decimolárního roztoku uhličitanu sodného a inkubován 30 min na ledu. Poté byl převeden do příslušné kyvety a centrifugován v ultracentrifuze Beckman L-90K na rotoru Ti-40 po dobu 1 h na 40 000 otáček/min. Supernatant obsahující solubilní proteiny byl odebrán do 15ml plastové zkumavky, pelet tvořený plastidovými membránami byl rozředěn ve 20  $\mu$ l vzorkového pufru, převeden do 1,5ml zkumavky a povařen ve vodní lázni. K supernatantu byly přidány 2 ml koncentrované kyseliny trichloroctové a směs byla 10 min inkubována na ledu a poté centrifugována v centrifuze Heraeus 1L-R po dobu 10 min na maximální výkon. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v ledově vychlazeném acetonu a převeden do 1,5ml zkumavky. Vzorek byl centrifugován ve stolní centrifuze po dobu 5 min na maximální výkon a poté byl stejným způsobem promyt acetonem ještě dvakrát. Získaný suchý pelet byl rovněž promísen s 20  $\mu$ l vzorkového pufru a povařen.

---

#### 4.2.3 Ověřování čistoty vzorku

---

##### 4.2.3.1 Mikroskopie

Pro ověření obohacení izolované frakce plastidy byla použita světelná mikroskopie s Nomarského kontrastem (DIC) a fluorescenční mikroskopie, při níž bylo využito červené autofluorescence těchto organel. Byl pozorován obsah plastidů ve frakci připravené gradientovou centrifugací a získané fotografie byly porovnávány s těmi ze světelného mikroskopu, pod nímž nejsou plastidy příliš dobře patrné. Mitochondriální marker nebyl použit.



#### 4.2.3.2 SDS-PAGE

Před další prací bylo nutné ověřit úspěšnost rozdělení jednotlivých frakcí. Základní metodou je SDS-PAGE proteinová elektroforéza. Použité pufrů jsou uvedeny v tabulce 4.4.

Vzorky byly nanášeny na 12% akrylamidový gel s 0,75mm spacerem (tab. 4.5) spolu s velikostním standardem (PageRuler prestained protein ladder, Thermo Scientific), aplikováno bylo napětí v rozmezí 100-150 V. Gel byl přes noc barven roztokem Coomassie brilliant blue a následující den odbarvován odbarvovacím roztokem na třepačce. Složení barvicího a odbarvovacího roztoku je uvedeno v tabulce 4.6.

Profily jednotlivých vzorků na gelu poskytují orientační náhled na to, zda byla izolace úspěšná: nakolik se vzorky liší či podobají navzájem a mezi jednotlivými experimenty.

**Tab. 4.4:** Složení pufrů pro SDS-PAGE

<b>pufr A = 30% Acrylamide/Bis solution (Bio-Rad)</b>	
<b>pufr B</b>	
destilovaná H <sub>2</sub> O	100 ml
SDS (dodecylsírán sodný)	10 g
<b>pufr C</b>	
destilovaná H <sub>2</sub> O	100 ml
Tris	9,1 g
SDS	0,2 g
<b>pufr D</b>	
destilovaná H <sub>2</sub> O	100 ml
Tris	3 g
SDS	0,2 g
<b>pufr E = 1x TGS (Bio-Rad)</b>	
<b>pufr F</b>	
pufr D bez SDS	1 ml
bromfenolová modř	10 mg

<b>pufr G</b>	
destilovaná H <sub>2</sub> O	10 ml
persíran amonný	1 g
<b>TEMED</b>	
<b>vzorkový pufr I</b>	
destilovaná H <sub>2</sub> O	4 ml
pufr C	2 ml
pufr D bez SDS	2,4 ml
pufr F	0,1 ml
glycerol	1 ml
2-merkптоethanol	0,5 ml

**Tab. 4.5:** Složení gelu

<b>12% gel</b>		<b>stacking gel</b>	
A	1,6 ml	A	0,24 ml
C	2 ml	D	0,75 ml
dH <sub>2</sub> O	0,32 ml	dH <sub>2</sub> O	0,47 ml
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl
G	40 µl	G	20 µl

**Tab. 4.6:** Složení barvicího a odbarvovacího roztoku Coomasie brilliant blue

<b>barvicí roztok CBB</b>	
destilovaná H <sub>2</sub> O	225 ml
methanol	225 ml
kyselina octová	50 ml
CBB (Serva)	250 mg
<b>odbarvovací roztok</b>	
destilovaná H <sub>2</sub> O	650 ml
methanol	250 ml
kyselina octová	100 ml

#### 4.2.3.3 Western blot

Pro zjištění, zda není membránová frakce kontaminována solubilními proteiny ze stromatu a lumen thylakoidů, byl použit Wester blot s protilátkou proti velké podjednotce RuBisCO. Použité roztoky, protilátky a jejich ředění jsou vypsány v tabulkách 4.7 a 4.8.

**Tab. 4.7:** Složení roztoku k blokaci, promývání a ředění protilátek a dalších roztoků

roztok mléka	
PBS	100 ml
sušené mléko	5 g
TWEEN (Sigma)	500 µl
barvicí roztok Ponceau	
destilovaná H <sub>2</sub> O	65 ml
kyselina octová	5 ml
Ponceau S (Sigma)	0,1 g
blotovací pufr	
destilovaná H <sub>2</sub> O	700 ml
methanol	200 ml
10x TGS (Bio-Rad)	100 ml

**Tab. 4.8:** Použité protilátky a jejich ředění

	primární protilátka	sekundární protilátka
<b>protilátka</b>	anti-RbcL ( <i>Euglena gracilis</i> )	anti-rabbit + AP
<b>výrobce</b>	Agrisera	Sigma
<b>vyprodukováno</b>	králík	koza
<b>ředění</b>	1 : 10 000	1 : 1 000

SDS-PAGE gel s rozdělenými proteiny z jednotlivých vzorků (totální vzorek z celého organismu, celoplastidová frakce, membránová frakce, případně ještě solubilní frakce) byl přebloťován na nitrocelulózovou membránu. Z gelu, nitrocelulózové membrány a dvou silných filtračních papírů nasáklých blotovacím pufrům byl sestaven sendvič v přístroji

Biometra Fastblot, který byl následně zapnut po dobu 1 hodiny na  $N$  mA, kde  $N = 1,5 \times$  obsah gelu v  $\text{cm}^2$ . Úspěšné přeblokování proteinů bylo ověřeno obarvením roztokem Ponceau. Blot byl přes noc blokován v roztoku mléka v chladničce ve  $4^\circ\text{C}$ . Druhý den byl inkubován s primární protilátkou po dobu alespoň 1 h na třepačce. Následně byl třikrát promyt roztokem mléka a poté inkubován se sekundární protilátkou po dobu 1 h též na třepačce. Z blotu byl poté odstraněn roztok sekundární protilátky, byl dvakrát promyt PBS s přidaným 0,5% TWEEN a nakonec jedenkrát pouze čistým PBS. Následně byl blot vyvolán vyvolávacím roztokem (substrátem pro alkalickou fosfatázu v tabletách SigmaFAST BCIP/NBT). V membránové frakci by v případě úspěšné izolace neměl být patrný pruh představující RbcL (velikost přibližně 52 kDa), který by však zároveň měl být přítomen ve vzorcích z celé buňky, celých plastidů a solubilních plastidových proteinů.

Stejným způsobem jsme se snažili detegovat i možnou (a s nejvyšší pravděpodobností do jisté míry přítomnou) mitochondriální kontaminaci ve všech vzorcích. Pro tento účel bylo vyzkoušeno množství dostupných protilátek proti mitochondriálním proteinům různých organismů, jejichž výčet je uveden v tabulce 4.9.

**Tab. 4.9:** Použité protilátky pro testování vhodného mitochondriálního markeru

proti proteinu	organismus	vyprodukováno	velikost proteinu	ředění
<b>Cpn60</b>	<i>Trimastix</i>	krysa	60 kDa	1 : 10 000
<b>Cpn60</b>	<i>Giardia</i>	králík	60 kDa	1 : 10 000
<b>Cpn60</b>	<i>Entamoeba</i>	králík	60 kDa	1 : 10 000
<b>frataxin</b>	<i>Trypanosoma</i>	králík	14 kDa	1 : 10 000
<b>GCSH</b>	člověk	myš	15 kDa	1 : 10 000
<b>Grx</b>	<i>Giardia</i>	králík	22 kDa	1 : 10 000
<b>Isd11</b>	<i>Trypanosoma</i>	králík	11 kDa	1 : 10 000
<b>Isd11</b>	<i>Trypanosoma</i>	krysa	11 kDa	1 : 10 000
<b>nifSb</b>	<i>Trypanosoma</i>	králík	45 kDa	1 : 10 000
<b>PFO</b>	<i>Trichomonas</i>	králík	120 kDa	1 : 10 000
<b>PNO</b>	<i>Euglena</i>	králík	150 kDa	1 : 10 000

## 4.3 Získávání sekvenčních dat

### 4.3.1 Sekvenace proteinového vzorku hmotnostní spektrometrií

Na připravený 12% 1mm SDS-PAGE gel bylo nanášeno 20 µl proteinového vzorku membránové frakce a tento byl rozdělen elektroforézou při napětí 100-150 V a následně z gelu vyříznut a rozdělen na několik částí podle velikosti. Vzorek byl analyzován tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) v servisní laboratoři hmotnostní spektrometrie biologické sekce. Prvním krokem bylo rozštěpání proteinů ve vzorku trypsinem na krátké peptidové fragmenty, které byly následně ionizovány. Tyto nabitě částice byly urychlovány v elektrickém poli a z jejich rychlosti je určena jejich přibližná hmotnost (metoda time-of-flight mass spectrometry). Tento proces, včetně štěpení, se odehrával dvakrát po sobě. Zároveň byly na krátké peptidy trypsinem *in silico* naštěpeny hypotetické proteiny z genomických či transkriptomických dat zkoumaného organismu, v tomto případě asembláž dostupných transkriptomických dat z *E. gracilis* z NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a našich vlastních sekvenčních dat (vizte podkapitolu 5.3.2.1), se kterými se následně v programu Mascot porovnávala naměřená data, čímž se k nim přiřadila konkrétní peptidy. Algoritmus dále přiřazoval osekvenované peptidy k sekvencím hypotetických proteinů a hodnotil významnost výsledků.

Sekvenace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie nelze provádět *de novo*, fyzický vzorek je vždy nutné porovnávat vůči sekvenčním datům z genomu či transkriptomu. Pro získání membránového proteomu zkoumaných euglenidů je třeba disponovat jak vzorkem proteinů, tak transkriptomem z obou z nich. Transkriptom *E. gymnastica* byl získán ze zdrojů Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (<http://marinemicroeukaryotes.org/>), většinu transkriptomu *E. gracilis* jsme museli v průběhu této práce připravit (vizte následující podkapitolu), část dat byla stažena z NCBI.

---

## 4.3.2 Sekvenace transkriptomu

---

### 4.3.2.1 Izolace RNA

Izolace RNA se provádí ve vyhrazené zóně ošetřené RNaseZap (Ambion) a s obdobně ošetřenými, RNáz prostými pomůckami a ochrannými prostředky. Kultura *E. gracilis* v exponenciální fázi růstu byla centrifugována 10 min na 2 500 g, supernatant byl odebrán a pelet byl resuspendován v příslušném množství TRI Reagent (Ambion) (900 µl na 10<sup>6</sup> buněk) a převeden do 15ml plastové zkumavky. Vzorek byl inkubován 5 min při pokojové teplotě, poté do něj byl přidán chloroform v poměrném množství (0,2 ml chloroformu na 1 ml TRI Reagent). Následně byla suspenze promísena na vortexu po dobu 15 s či dokud nezískala mléčný zákal, poté se nechala 2 min stát při pokojové teplotě. Dalším krokem byla vysokorychlostní centrifugace v centrifuze Heraeus 1L-R 15 min na 13 200 rpm a při 4 °C, při níž dochází k rozdělení na fáze obsahující DNA, RNA a denaturované proteiny. Vrchní fáze, tedy celková RNA, byla odebrána, převedena do další 15 ml zkumavky a byl k ní přidán izopropanol (0,5 ml izopropanolu na 1 ml použitého TRI Reagent). Suspenze byla promísena na vortexu po dobu 15 s a inkubována 10 min při pokojové teplotě. Poté byla centrifugována 10 min na 13 200 rpm při 4 °C. Supernatant byl odebrán a pelet omyt ledově vychlazeným 75% ethanolem opětovnou centrifugací 10 min na 13 200 rpm. Ethanol byl slit a odebrán pipetou a pelet ponechán v otevřené zkumavce při pokojové teplotě pro vysušení. Téměř vyschlý pelet byl rozpuštěn ve 35 µl DEPC H<sub>2</sub>O a inkubován 10 min ve vodní lázni při teplotě 60 °C.

Koncentrace získaného vzorku byla změřena na spektrometru NanoDrop. Jeho složení, míra degradace RNA a případná přítomnost DNA kontaminace, byla přibližně určena z profilu na elektroforéze na agarózovém gelu. Vzorek vykazující na základě těchto metod nejslibnější výsledky byl ještě před odesláním k sekvenaci analyzován pomocí přístroje Bioanalyzer Ing. Miluší Hroudovou, Ph.D. z Ústavu molekulární genetiky AV ČR.

---

#### 4.3.2.2 Příprava transkriptomu *E. gracilis*

Vzorek RNA byl sekvenován v centru Beijing Genomics Institute (BGI) v Hong Kongu metodou Illumina na sekvenátoru HiSeq 2000.

Transkriptomová databáze použitá pro následující analýzy byla sestavena Mgr. Annou Karnkowskou, Ph.D. v programu Trinity (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>) z dat ze tří zdrojů:

1. výše zmíněná sekvenční data vyprodukovaná v BGI z našeho vzorku RNA
2. na NCBI dostupná data, převážně z EST (23 394 sekvencí)
3. experimentální data z knihovny SRA na NCBI (162 859 čtení)

Takto vytvořený soubor byl skriptem vytvořeným Mgr. Vojtěchem Žárským přeložen do proteinové sekvence v šesti čtecích rámcích s minimální délkou proteinu 50 aa. S tímto souborem bylo poté pracováno ve všech v této práci popsanych bioinformatických metodách.

## 4.4 Bioinformatická analýza dat

Nově získaná i stávající transkriptomická data a výsledky ze sekvenace hmotnostní spektrometrií byly analyzovány různými programy a nástroji dostupnými přes webový prohlížeč (tab. 4.10).

**Tab. 4.10:** Použité webové nástroje a programy

<b>BLAST</b>	<a href="http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
<b>Blast2GO</b>	<a href="http://www.blast2go.com/b2ghome">http://www.blast2go.com/b2ghome</a>
<b>HHPred</b>	<a href="http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred">http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred</a>
<b>Pfam</b>	<a href="http://pfam.xfam.org/">http://pfam.xfam.org/</a>
<b>TMHMM</b>	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>
<b>PRED-TMBB</b>	<a href="http://bioinformatics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/">http://bioinformatics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/</a>
<b>ProtParam</b>	<a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a>
<b>ProtScale</b>	<a href="http://web.expasy.org/protscale/">http://web.expasy.org/protscale/</a>
<b>iPSORT</b>	<a href="http://ipsort.hgc.jp/">http://ipsort.hgc.jp/</a>
<b>signalP</b>	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>
<b>plasmoAP</b>	<a href="http://v4-4.plasmodb.org/restricted/PlasmoAPcgi.shtml">http://v4-4.plasmodb.org/restricted/PlasmoAPcgi.shtml</a>
<b>WebLogo</b>	<a href="http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi">http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi</a>

### 4.4.1 Anotace proteomu

Sekvence hypotetických proteinů byly analyzovány algoritmem BLAST vůči neredundantní databázi proteinových sekvencí (nr) na serveru NCBI a tímtež algoritmem na lokálním serveru proti databázi proteinových rodin Pfam. Současně byla sbírána data o jejich aminokyselinovém složení, délce, poměru záporně a kladně nabitých reziduí pomocí ProtParam. Jako nástroj pro orientační predikci lokalizace proteinů podle případného identifikovaného signálního či tranzitního peptidu byl použit iPSORT nastavený tak, aby data vyhodnocoval jako rostlinná, tedy počítal s možnou lokalizací jak do mitochondrie, tak do



chloroplastu. Všechny sekvence byly také analyzovány algoritmy PRED-TMBB a TMHMM založenými na HMM (Hidden Markov model, skrytý Markovův model), které ze sekvence predikují sekundární strukturu, PRED-TMBB  $\beta$ -barely a TMHMM transmembránové helixy. Všechny hodnoty pro jednotlivé hypotetické proteiny byly zaznamenávány do souhrnné tabulky. Za účelem získání grafického výstupu shrnujícího proteinové složení vzorku byla provedena rovněž automatická anotace programem Blast2GO.

---

#### 4.4.2 Analýza N-terminálních domén

Na základě multiple-alignmentu vypracovaného algoritmem BLAST byly ze souboru odebrány prokazatelně nekompletní sekvence s chybějícím úsekem na N-konci, ve zbylých byla postupným manuálním prohlížením v programu BioEdit sledována přítomnost do sekvence aa přeloženého splice-leaderu. V cDNA má tento podobu TTTTTTTCG na 5'-konci, ještě před iniciačním kodonem (Durnford *et* Gray 2006). Po *in silico* převedení do proteinové sekvence se tedy jeví jako tripeptid FFS, FFR, FFA, FFV, FFE, FFD či FFG (podle čtecího rámce) na úplném začátku hypotetického proteinu.

Na základě přítomnosti SL či start-kodonu (přeloženého jako M) byly vybrány sekvence s kompletním N-koncem. Ty byly následně analyzovány algoritmem TMHMM, který predikuje transmembránové helixy a úseky mezi nimi jako intracelulární či extracelulární, a také signalP predikujícím signální peptid a plasmoAP predikujícím signální sekvenci pro import do apikoplastu. Rovněž byla měřena a do Kyte-Doolittleova diagramu vynášena jejich hydrofobicita pomocí webového nástroje ProtScale, a to dvakrát s různou velikostí okna (7 a 19 znaků). U sekvencí s pozitivním výsledkem alespoň v některých z těchto sledovaných kategorií byla následně ručně v BioEditu analyzována oblast mezi 50. a 70. pozicí, tedy část sekvence, jež by mohla kódovat tranzitní peptid, přičemž jsme si všímali aminokyselinového složení, zejména obsahu hydroxylovaných (S, T, Y) a kyselých (E, D) reziduí a alaninu (A). Tabulka 4.11 popisuje obvyklé procentuální zastoupení těchto tříd aminokyselin v proteinech euglenidů (Kott *et* Wachs 1964) a počty reziduí ve zkoumané 20 aa dlouhé oblasti, které byly považovány za významně zvýšené či snižené. Ze sekvencí z většiny splňujících tyto vlastnosti, tedy potenciálních TP, bylo za použití programu WebLogo vypracováno proteinové logo.

**Tab. 4.11:** Zastoupení vybraných aminokyselin v proteinech eugleny a zvolená hranice pro stanovení jejich zvýšeného či sníženého obsahu

kategorie aa	normální zastoupení	hraniční počet	zvýšený počet
<b>S + T + Y</b>	10,6 + 4,5 + 0,7 %	3 (15 %)	4 a více
<b>A</b>	15,8 %	3 (15 %)	4 a více
<b>E + D</b>	7,1 + 9,5 %	2 (10 %)	1 a méně

#### 4.4.3 Predikce potenciálních transportérů v transkriptomu *E.gracilis* a *E. gymnastica*

V transkriptomech obou zkoumaných euglenidů byly *in silico* pomocí algoritmu HMMER (pracujícího rovněž na principu HMM), vyhledávány homologы různých proteinů, které by se mohly účastnit mašinerie transportující proteiny přes obalové membrány plastidu: podjednotek komplexů TOC a TIC, proteinů zapojených do degradační dráhy ERAD, jež by stejně jako u některých jiných organismů se sekundárním plastidem, mohla být zduplikována a využívána pro import, a proteinů z rodiny SNARE, které zprostředkovávají rozeznávání a splývání váčků. U potenciálně zajímavých sekvencí nalezených v transkriptomu *E. gracilis* bylo navíc pomocí algoritmu BLAST na lokálním serveru zjišťováno, zda se tyto nacházejí i v proteomu plastidových membrán.

##### 4.4.3.1 Predikce komponent TOC a TIC komplexů v transkriptomu

Z databáze GenBank byly náhodně vybrány a staženy reprezentativní proteinové sekvence homologů jednotek komplexů TOC a TIC (Toc12, Toc34, Toc64, Toc75, Toc159, Tic20, Tic21, Tic22, Tic32, Tic40, Tic55, Tic62 a Tic110) z různých organismů a rovněž sekvence jejich typických domén podle NCBI (tab. 4.12). Ze sekvencí byly vytvořeny alignmenty pomocí nástroje ClustalW multiple alignment v programu BioEdit. K hledání homologů podle profilů vytvořených na základě těchto referenčních alignmentů v našich transkriptomických datech byl použit algoritmus HMMER.

**Tab. 4.12:** Konzervované domény podjednotek komplexů TOC a TIC použité pro vyhledávání jejich homologů

	konzervované domény
<b>Tic20</b>	3a0901s05TIC20
<b>Tic21</b>	DUF3611
<b>Tic22</b>	3a0901s06TIC22
<b>Tic32</b>	retinol_DH-like_SDR_c-like
<b>Tic55</b>	PaO Rieske_RO_Alpha_Tic55
<b>Tic62</b>	PLN03209 Sdr_a5
<b>Toc12</b>	cd06257DnaJ
<b>Toc34</b>	Toc34-like
<b>Toc64</b>	GGCT-like TPR
<b>Toc75</b>	3a0901s03IAP75 Bac_surface_Ag
<b>Toc159</b>	DUF3406 Toc34-like

Pro hledání homologů v transkriptomu byly použity tři nezávislé přístupy:

- 1) V prvním případě byl použit pouze alignment stažených referenčních sekvencí jednotlivých podjednotek komplexů TOC a TIC.
- 2) Ve druhém případě byl postup rozdělen do několika kroků. Nejprve byly podle alignmentu referenčních sekvencí vyhledány homology podjednotek TOC a TIC v transkriptomu *Pyramimonas* připraveném ze sekvenčních dat získaných Mgr. Janou Szabovou a ze zdrojů Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project a transkriptomech dalších chlorophytních řas stažených z GenBank (*Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Micromonas*, *Ostreococcus*, *Bathycoccus* a *Tetraselmis*). Homologie nejlépe skórovaných výsledků byla ověřena algoritmy BLAST a HHPred a tyto

sekvence byly následně přidány do stávajících alignmentů a teprve přes tento obohacený soubor byly prohledávány transkripty *E. gracilis* a *E. gymnastica*.

- 3) Ve třetím případě nebyly použity alignmenty celých proteinů Toc a Tic, ale pouze jejich konzervovaných domén. V případě proteinů s více než jednou doménou byly z dílčích výsledků k detailnější analýze vybrány pomocí jednoduchého skriptu pouze sekvence obsahující obě tyto domény.

Nalezené potenciální homology byly opět analyzovány pomocí BLAST a HHPred.

---

#### 4.4.3.2 Predikce komponent ERAD v transkriptomu a membránovém proteomu

Obdobným způsobem byly v transkriptomech obou zkoumaných euglenidů vyhledávány homology komponent dráhy ERAD, konkrétně proteinů Hrd1, Hrd3, Der1, Yos9, Usa1 a Doa10. Z GenBank byly rovněž náhodně vybrány a staženy referenční sekvence ve formě multiple-alignmentu, který byl použit pro prohledávání obou transkriptomů algoritmem HMMER. Získané sekvence byly taktéž analyzovány pomocí BLAST a HHPred. U potenciálních homologů proteinů dráhy ERAD nalezených v transkriptomu *E. gracilis* bylo následně pomocí lokálně spuštěného BLAST zjišťováno, zda se nacházejí v membránovém plastidovém proteomu.

---

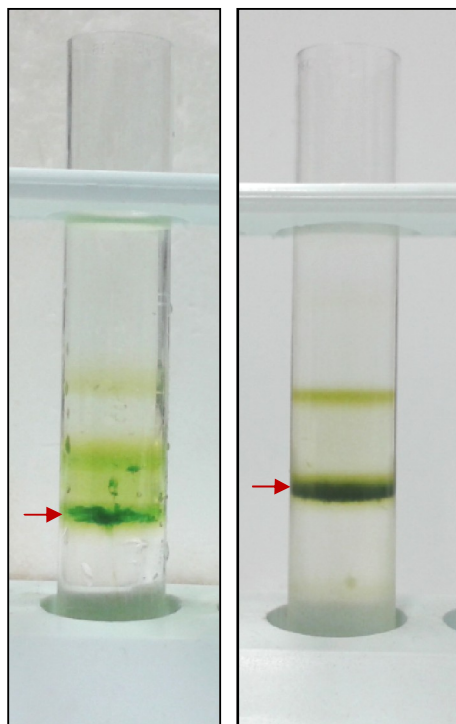
#### 4.4.3.3 Predikce SNARE proteinů v transkriptomu a membránovém proteomu

Z databáze Pfam byl stažen náhodně vygenerovaný modelový multiple-alignment proteinů z rodiny SNARE, který byl následně použit jako vzorový alignment pro HMMER. Homology SNARE proteinů nalezené v transkriptomu *E. gracilis* byly poté opět pomocí BLAST vyhledávány v proteomu.

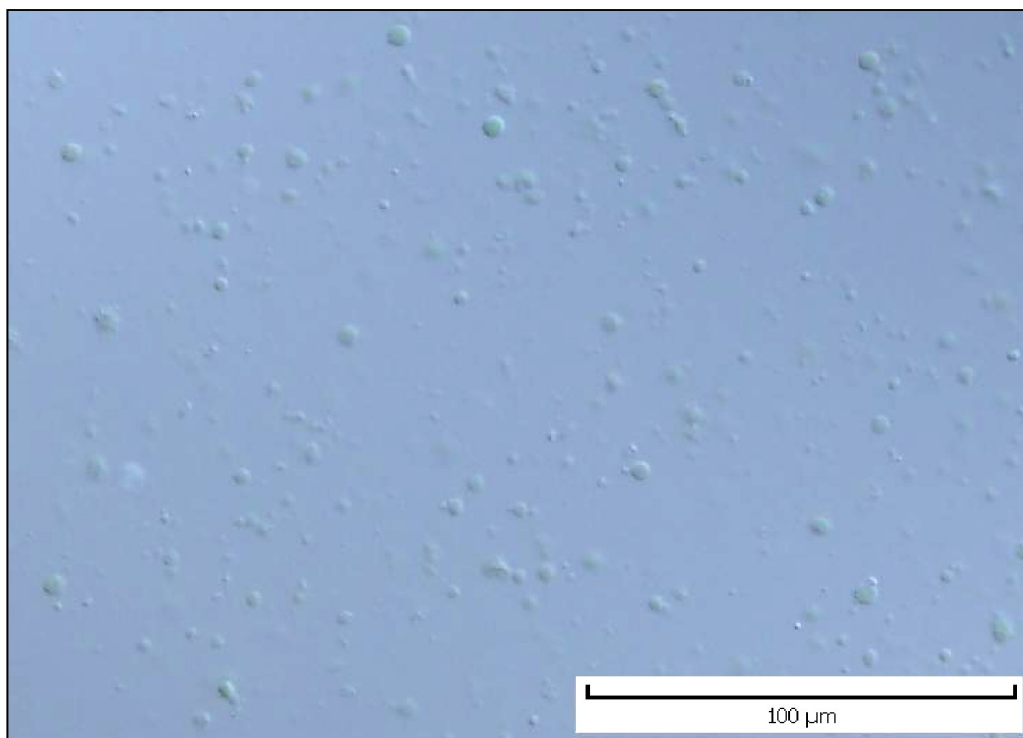
## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Izolace plastidů a plastidových membrán *E. gracilis* a *E. gymnastica*

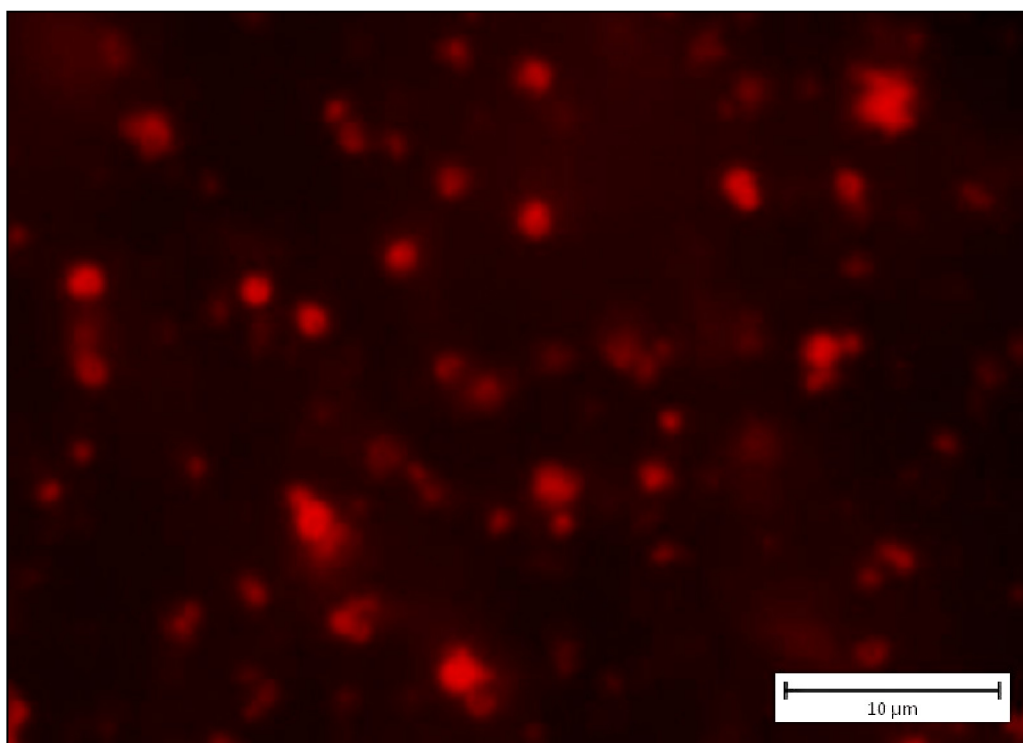
Pomocí gradientové centrifugace buněčného homogenátu se podařilo z *E. gracilis* i *E. gymnastica* připravit frakce výrazně obohacené o intaktní i částečně narušené plastidy. Tyto fáze byly na gradientu patrné jako výrazný, tmavě zelený pruh na rozhraní 20% a 25% OptiPrepu (obr. 5.1). Vysoký obsah plastidů potvrdila jak světelná (obr. 5.2), tak fluorescenční mikroskopie, při níž bylo využito autofluorescence pigmentů v plastidech přirozeně obsažených (obr. 5.3).



**Obr. 5.1:** Na rozhraní 20% a 25% složky OptiPrepového gradientu patrná plastidová frakce *E. gracilis* (vlevo) a *E. gymnastica* (vpravo). Na fotografii je zvláště u *E. gracilis* (vlevo) rozeznatelná nehomogenní struktura frakce způsobená „clumping“ plastidů, což je jev provázející práci s plastidy, při němž dochází k jejich agregaci v lepidivé shluky. To snižuje kvalitu zkoumaného materiálu, a proto je záhodno snažit se jej omezit na minimum (Doonan 1996). Příliš velké míře shlukování jsme se snažili vyhnout použitím co nejčerstvější kultury v exponenciální fázi růstu.



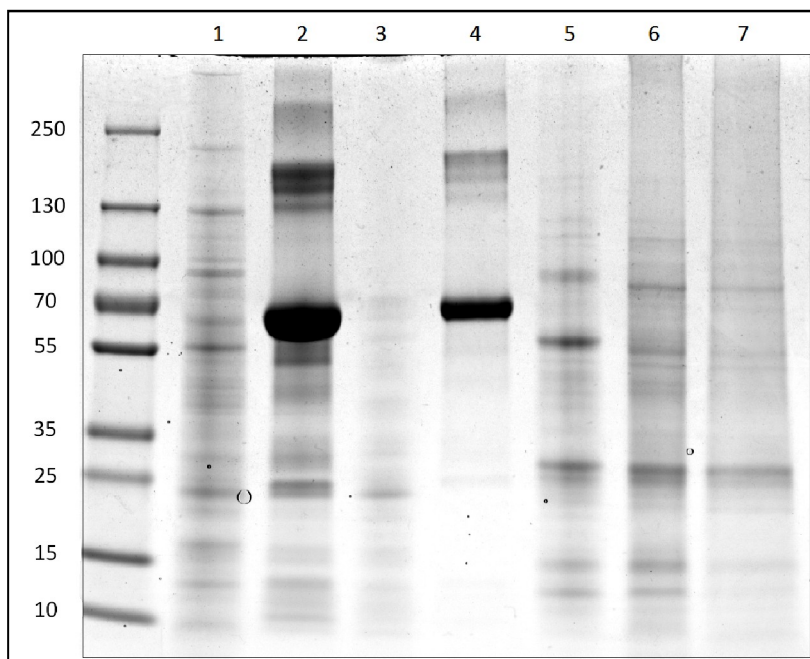
**Obr. 5.2:** Plastidová frakce *E. gracilis* pod světelným mikroskopem s DIC kontrastem



**Obr. 5.3:** Autofluorescence plastidové frakce *E. gymnastica*

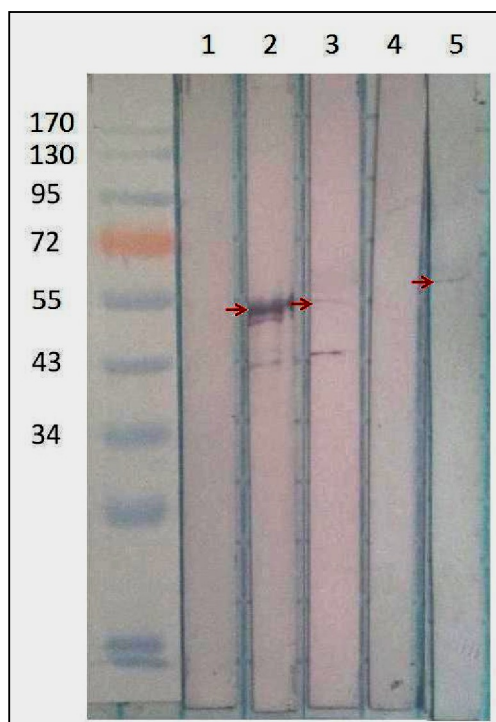
### 5.1.1 Kontrola čistoty izolované frakce

Izolace plastidů a následně i jejich membrán z *E. gracilis* se zdařila, zatímco v případě *E. gymnastica* dopadla nedostatečně, jak demonstruje obrázek 5.4.



**Obr. 5.4:** SDS-PAGE gel srovnávající vzorky izolované z *E. gracilis* a *E. gymnastica*. U *E. gracilis* (1-4) je dobře patrný odlišný profil jednotlivých frakcí: totálního proteinového vzorku z celého organismu (1), celých plastidů (2), plastidových membrán (3) a solubilní frakce (4). U *E. gymnastica* vykazuje celoplastidová (6) a membránová (7) frakce prakticky stejný profil, který se navíc příliš neliší od totálního vzorku (5), což ukazuje na částečné či úplné selhání izolační metody. Silný pruh o velikosti asi 66 kDa ve vzorcích *E. gracilis* představuje BSA, který byl obsažen v dříve používaném izolačním pufru. Jeho přítomnost výsledky neovlivňuje, navíc může v tomto případě sloužit jako další způsob demonstrace dobrého oddělení solubilní a membránové frakce, v níž není patrný.

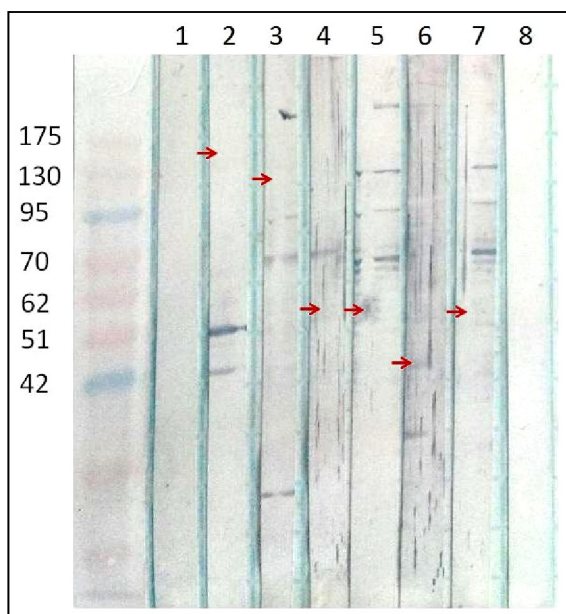
Na úspěšné rozdělení frakcí ukazuje i výsledek Western blotu (obr. 5.5) s protilátkou proti velké podjednotce RuBisCO *E. gracilis*. Tento enzym je solubilní a přítomný v lumen thylakoidů. Jeho přítomnost v celoplastidové a solubilní frakci připravené z *E. gracilis* a naopak nepřítomnost ve frakci membránové tedy indikuje oddělení membránového vzorku bez výraznější kontaminace solubilními proteiny.



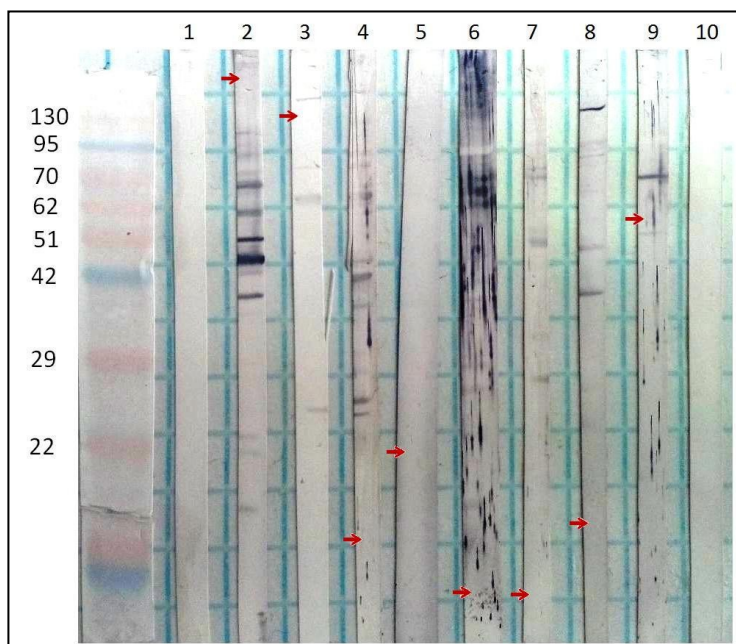
**Obr. 5.5:** Western blot srovnávající izolované frakce z *E. gracilis*, totální proteinový vzorek (2), celé plastidy (3), plastidové membrány (4) a solubilní frakce (5), pomocí protilátky proti RbcL. Dráha 1 představuje negativní kontrolu bez primární protilátky. V totálním (2) a celoplastidovém vzorku (3) je šipkami označený pruh o velikosti přibližně 52 kDa představující RbcL, který je přítomen i v solubilní frakci (5), nikoli však ve frakci membránové (4). Izolované plastidové membrány tedy zřejmě nebyly výrazněji zkontaminovány solubilními proteiny. Zdánlivě vyšší molekulární hmotnost značeného proteinu v dráze 5 je způsobena nerovnoměrným průběhem elektroforézy (tzv. „smiling effect“ – čela drah netvořila horizontální, nýbrž lehce zkosenou linii).

I přes opakované pokusy s množstvím různých protilátek nebyl nalezen spolehlivý marker, který by bylo možno použít pro vyloučení či potvrzení a přibližnou kvantifikaci mitochondriální kontaminace přítomné v plastidové frakci, ať už pomocí Western blotu či fluorescenční mikroskopie. Některé protilátky s proteiny *E. gracilis* vůbec nereagovaly, jiné se vážaly nespecificky (obr. 5.6 a 5.7).





**Obr. 5.6:** Western blot totálního proteinového vzorku, na němž byly testovány různé protilátky proti mitochondriálním proteinům: PNO eugleny (2), PFO trichomonády (3), Cpn60 trimastixe (4), giardie (5) a entamoeb (7) a nifSb trypanosomy (6). Dráhy 1 a 8 představují negativní kontroly. Šipky označují předpokládané velikosti pruhů v případě specifické vazby protilátky. Jak je patrné z obrázku, všechny tyto testované protilátky s proteiny *E. gracilis* reagovaly nespecificky a nemohly být použity pro naše experimenty.



**Obr. 5.7:** Western blot totálního proteinového vzorku, na němž byly testovány různé protilátky proti mitochondriálním proteinům: PNO eugleny (2), PFO trichomonády (3), frataxinu trypanosomy (4), Grx giardie (5), Ids11 trypanosomy (6, 7), GCSH člověka (8) a Cpn60 trimastixe (9). Dráhy 1 a 10 představují negativní kontroly. Šipky označují předpokládané velikosti pruhů v případě specifické vazby protilátky. Žádná s protilátek se opět neukázala být použitelnou: anti-Grx nereagovala vůbec, zbylé protilátky vykazovaly nespecifické reakce.

S *E. gymnastica* nebyl obdobný experiment proveden, neboť jsme vzhledem k podobně atypické povaze její mitochondrie očekávali stejně neuspokojivé výsledky a rozhodli se nemarnit čas a materiál.

Dále bylo tedy pracováno se vzorky, v nichž nebyly vyloučeny, ba naopak, byly velmi pravděpodobně přítomny i mitochondriální proteiny. Ty se do něj dostaly s fragmenty těchto velkých retikulárních organel, které měly shodou okolností podobnou velikost a hustotu jako izolované plastidy a nebyly tedy vzhledem k použité izolační metodě odstraněny. To bylo potvrzeno při anotaci dat z hmotnostní spektrometrie (vizte podkapitulu 5.3.1) a s tímto faktem bylo nutno počítat při jejich dalším zpracovávání a vyhodnocování.

Stejného výsledku se zatím nepodařilo dosáhnout s *E. gymnastica*, u níž patrně v důsledku poněkud jiných fyzikálních vlastností plastidů dochází k nedostatečnému oddělení membránové a solubilní frakce. Vzorek membránové frakce z *E. gymnastica* nebyl připraven v dostatečné kvalitě a tudíž ani nebyl sekvenován.

## 5.2 Izolace a sekvenace RNA *E. gracilis*

Koncentrace získaného vzorku RNA byla pomocí NanoDrop stanovena na 4 511 ng/μl, při přesnějším měření přístrojem Bioanalyzer pak na 2 813 ng/μl. Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu i analýzy provedené v ÚMG ukázal nepřítomnost kontaminace DNA a poměrně nízkou míru degradace RNA.

Při sekvenaci bylo vygenerováno 4 889 038 500 nt v 54 322 650 čteních, z nichž bylo v sekvenačním centru složeno 101 028 contigů o celkové délce 34 910 958 nt, průměrné délce contigu 346 nt a N50 = 553 nt.

Pro následné analýzy byl používán transkriptomový dataset složený ze tří různých zdrojů, který po odstranění redundantních dat sestával z 27 347 578 sekvencí představujících jak contigy, tak samostatná čtení. Asemblováním těchto dat vznikl finální soubor obsahující 98 675 DNA contigů a jeho v šesti čtecích rámcích přeložená verze se pak skládala z 891 923 proteinových sekvencí, s nimiž bylo nadále pracováno. Oba soubory jsou k nahlédnutí a dispozici na přiloženém CD.

## 5.3 Analýza proteinových sekvencí *E. gracilis* získaných hmotnostní spektrometrií

### 5.3.1 Anotace membránového proteomu plastidu *E. gracilis*

Programem Mascot bylo na základě transkriptomické databáze ve vzorku proteinů membránové frakce identifikováno 149 hypotetických proteinů, z toho 127 s „bold-red“ skóre a 23 méně signifikantních sekvencí. Označení „bold“ znamená, že přiřazení peptidů k danému proteinu má signifikantnější skóre, než jejich přiřazení k jakémukoli dalšímu, jako „red“ jsou pak označeny shody, v nichž byly dané peptidy použity poprvé. Získaná sada identifikovaných proteinů je k nahlédnutí a dispozici na přiloženém CD.

Výsledky anotace proteomu pomocí použitých programů shrnují následující tabulky 5.1–5.6 a obrázky 5.8–5.9.

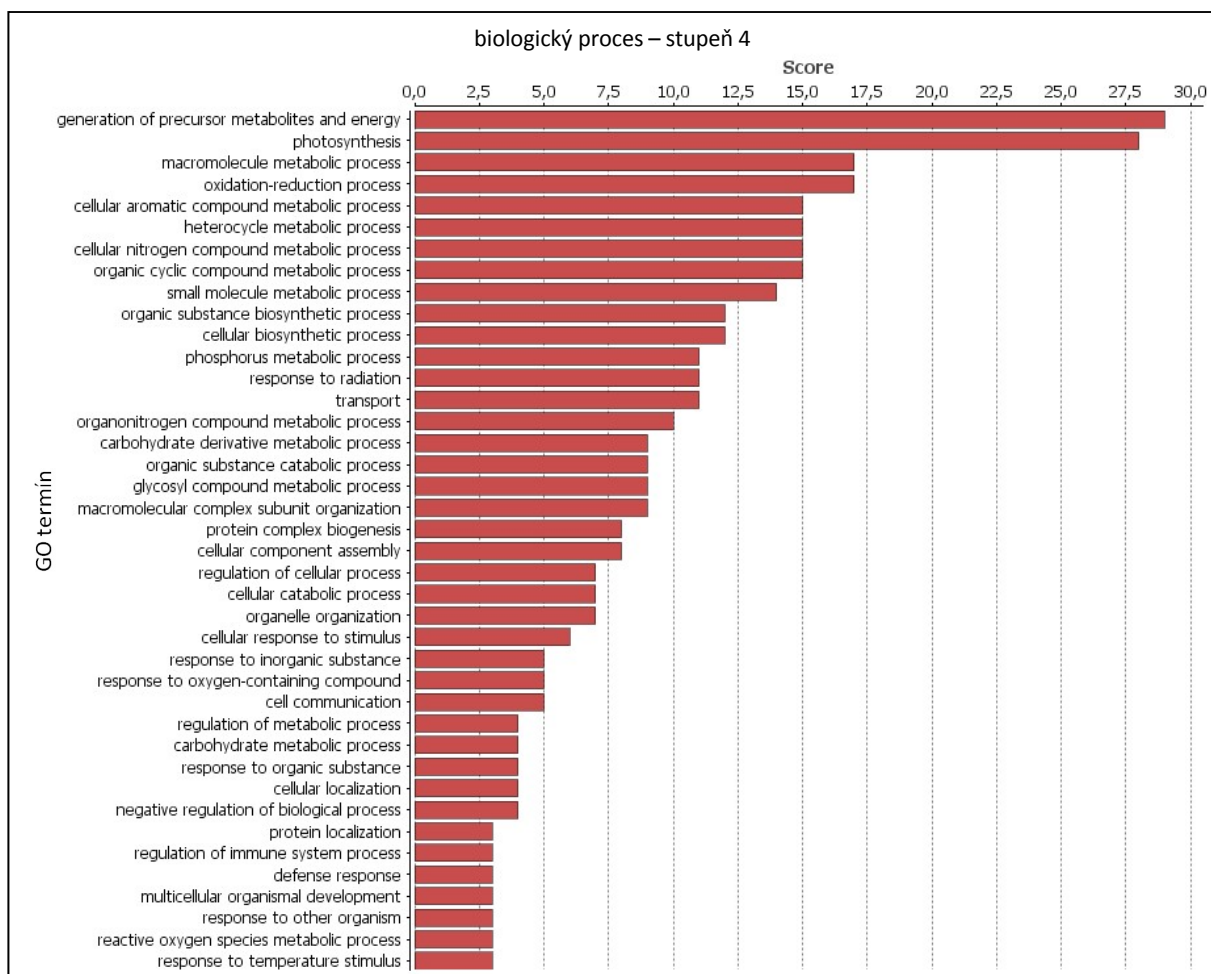
**Tab. 5.1:** Výsledky ruční anotace proteomu membránové frakce plastidu *E. gracilis* podle homologií nalezených pomocí algoritmu BLAST v proteinové databázi nr na NCBI a proteinových rodin a domén v databázi Pfam.

	ID identifikace	homologie podle BLAST	proteinová rodina podle Pfam
1	c40019g1i1 frame 6	hypothetical	N/A
2	c40691g1i1 frame 4	cytochrome c oxidase subunit IV	N/A
3	c40019g1i5 frame 4	hypothetical	N/A
4	c12023g1i1 frame 1	cytochrome c oxidase subunit 6a	N/A
5	c16003g1i1 frame 3	N/A	N/A
6	c25450g1i1 frame 2	histone h4	Histone
7	c42719g1i3 frame 4	mitochondrial ATP/ADP translocase	Mito carr
8	c25050g1i1 frame 4	porin-like protein/mitochondrial outer membrane porin	Porin 3
9	c52761g1i1 frame 6	hypothetical	N/A
10	c28496g1i1 frame 2	hypothetical	N/A
11	c38192g1i2 frame 2	chloroplast light-harvesting complex II	Chloroa b-bind
12	c42155g2i1 frame 3	chloroplast light-harvesting complex I	Chloroa b-bind
13	c40880g2i3 frame 1	chloroplast light-harvesting complex II	Chloroa b-bind
14	c42719g1i1 frame 4	mitochondrial ATP/ADP translocase	Mito carr
15	c42155g1i2 frame 2	chloroplast light-harvesting complex I	Chloroa b-bind
16	c54735g1i1 frame 5	photosystem II protein	Psbl
17	c16842g1i1 frame 2	hypothetical	N/A
18	c40880g2i4 frame 3	chlorophyll ab binding protein	Chloroa b-bind
19	c44722g1i1 frame 6	hypothetical	UCR 14kD
20	c53721g1i1 frame 4	hypothetical	N/A
21	c44567g1i3 frame 2	chloroplast light-harvesting complex I	Chloroa b-bind
22	c26612g1i1 frame 6	hypothetical: alpha-amylase	N/A
23	c38192g1i1 frame 3	chloroplast light-harvesting complex II	Chloroa b-bind
24	c19455g1i1 frame 2	mitochondrial solute carrier	Mito carr
25	c12415g1i1 frame 4	hypothetical	N/A
26	c38480g1i1 frame 2	mitochondrial processing peptidase / complex III subunit	peptidase M16
27	c4575g1i1 frame 3	hypothetical	N/A
28	c24031g1i1 frame 2	photosystem chlorophyll a apoprotein	PsA, PsB, cytochrome b559
29	c30610g1i1 frame 3	cytochrome c oxidase subunit V	N/A
30	c41017g1i1 frame 3	chloroplast light-harvesting complex I	Chloroa b-bind
31	c22610g1i1 frame 4	hypothetical	N/A
32	c30807g2i1 frame 2	hypothetical: alpha-amylase / complex III	N/A

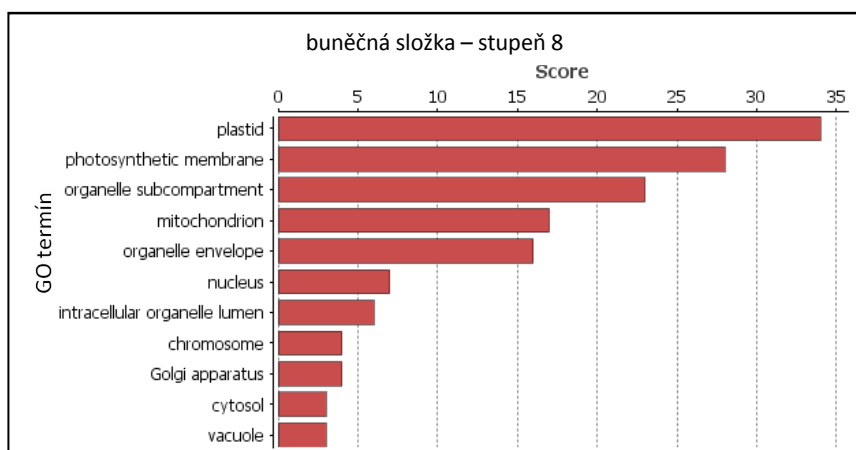
33	c44127g1i1	frame 5	chloroplast light-harvesting complex I	Chloroa b-bind
34	c57484g1i1	frame 6	hypothetical	N/A
35	c10155g1i1	frame 6	hypothetical	N/A
36	c6371g1i1	frame 3	hypothetical	N/A
37	c7122g1i1	frame 2	hypothetical: ATP/GTP binding protein / transcription regulator	N/A
38	c26285g1i1	frame 5	hydrolase / hypothetical	N/A
39	c44759g1i1	frame 3	chitinase / glycosyl transferase / hypothetical	N/A
40	c13339g1i1	frame 3	MFS transporter	COX3
41	c429g1i1	frame 1	photosystem II D2 domain	N/A
42	c42155g3i1	frame 3	chloroplast light-harvesting complex I	Chloroa b-bind
43	c32573g1i1	frame 1	mitochondrial processing peptidase	peptidase M16
44	c57075g1i1	frame 4	hypothetical: geranylgeranyl PPI synthase / farnesyl diphosphate synthase / ...	N/A
45	c31092g1i1	frame 3	hypothetical	N/A
46	c40228g1i1	frame 6	hypothetical: transcriptional regulator / cathepsin-like / DNase / ...	N/A
47	c18861g1i1	frame 6	hypothetical	N/A
48	c40880g2i1	frame 3	chlorophyll ab binding protein	Chloroa b-bind
49	c24155g1i1	frame 3	peroxiredoxin	N/A
50	c36803g1i1	frame 3	chloroplast light-harvesting complex I	Chloroa b-bind
51	c44567g2i1	frame 3	chloroplast light-harvesting complex I	Chloroa b-bind
52	c57344g1i1	frame 4	hypothetical	N/A
53	c35502g1i1	frame 6	chaperone protein DnaJ	DnaJ
54	c29119g1i1	frame 4	hypothetical: dTDP-glucose 4,6-dehydratase	N/A
55	c40980g1i1	frame 4	malate synthase-isocitrate lyase	malate synthase, ICL
56	c38624g1i1	frame 4	ATP synthase subunit	ATP-synt ab
57	c4934g1i1	frame 3	ATP synthase subunit	ATP-synt ab
58	c6206g1i1	frame 1	photosystem chlorophyll a apoprotein	PSII
59	c18024g1i1	frame 4	zinc finger protein	N/A
60	c24876g1i1	frame 6	hypothetical	N/A
61	c32606g1i1	frame 4	cytochrome f	Apocytochr F C
62	c8647g1i1	frame 4	N/A	N/A
63	c36432g1i1	frame 6	NADH dehydrogenase subunit 7	Complex1 49kDa
64	c20864g1i1	frame 1	Histone h2b	Histone
65	c44018g1i2	frame 3	alcohol dehydrogenase	ADH N, ADH zinc N
66	c44018g1i1	frame 3	alcohol dehydrogenase	ADH N, ADH zinc N
67	c20622g1i1	frame 1	chloroplast light-harvesting complex II	Chloroa b-bind
68	c14514g1i1	frame 3	hypothetical	N/A
69	c44288g1i2	frame 1	N/A	N/A
70	c67333g1i1	frame 1	photosystem II protein D1	Photo RC
71	c23352g1i1	frame 5	3-beta-hydroxy-delta(5)-steroid dehydrogenase	N/A
72	c5559g1i1	frame 1	ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	Rieske
73	c43667g1i1	frame 3	acyl-CoA dehydrogenase	Acyl-CoA dh N, M, 1, C
74	c37071g1i1	frame 4	N/A	N/A
75	c67193g1i1	frame 5	hypothetical	N/A
76	c24018g1i1	frame 4	N/A	N/A
77	c17050g1i1	frame 2	hypothetical	N/A
78	c43481g3i2	frame 3	photosystem I protein Psad	Psad
79	c38185g1i4	frame 3	N/A	N/A
80	c38185g1i1	frame 5	ATP synthase subunit	OSCP, ATP-synt B
81	c37044g1i1	frame 5	hypothetical	N/A
82	c39914g1i1	frame 3	dehydratase	N/A
83	c29771g1i1	frame 6	NAD(P) transhydrogenase	AlaDh PNT N, C, DUF3814, PNTB
84	c29256g1i1	frame 2	hypothetical	Mito carr
85	c21669g2i1	frame 2	hypothetical	RRM 1
86	c21669g1i1	frame 4	hypothetical	N/A
87	c57155g1i1	frame 1	hypothetical	N/A
88	c29598g1i1	frame 2	photosystem II protein M	PsbM
89	c36273g1i1	frame 4	cytochrome b6f	CytB6-F_Fe-S, Rieske
90	c30978g1i1	frame 1	N/A	N/A
91	c26232g1i1	frame 5	ras-related protein	Ras
92	c39504g1i2	frame 5	chloroplast light-harvesting complex I	Chloroa b-bind
93	c39588g1i1	frame 4	hypothetical	zf-MYND
94	c44404g1i4	frame 2	hypothetical	Mito carr
95	c43384g1i1	frame 1	saccharopine dehydrogenase	Saccharop_dh
96	c43481g1i1	frame 5	photosystem I protein Psad	Psad
97	c26717g1i1	frame 2	hypothetical	N/A
98	c29292g1i1	frame 1	hypothetical	N/A
99	c22372g1i1	frame 3	hypothetical	N/A
100	c6814g1i1	frame 4	ATP synthase beta chain	ATP-synt ab, ab N, ab C
101	c34890g2i1	frame 5	hypothetical	Hexapep, Hexapep 2

102	c40633g2i1	frame 4	N/A	N/A
103	c32797g1i1	frame 2	N/A	N/A
104	c40190g1i1	frame 4	N/A	N/A
105	c32741g1i1	frame 3	hypothetical	N/A
106	c66477g1i1	frame 6	elongation factor 1 alpha	GTP EFTU, GTP EFTU D2
107	c43524g1i1	frame 1	elongation factor 1 alpha	GTP EFTU, GTP EFTU D2
108	c37797g1i1	frame 3	GTP binding Elongation factor	GTP EFTU
109	c20883g1i1	frame 4	N/A	N/A
110	c34943g1i2	frame 4	N/A	N/A
111	c33454g1i1	frame 5	hypothetical	NDUFA12
112	c39670g1i1	frame 2	N/A	N/A
113	c40880g2i5	frame 2	chloroplast light-harvesting complex II protein precursor	Chloroa b-bind
114	c23581g1i1	frame 6	ABC transporter ATP-binding protein	N/A
115	c25740g1i1	frame 2	cytochrome c1	Cytochrom_C1
116	c12354g1i1	frame 2	N/A	N/A
117	c5722g1i1	frame 6	N/A	N/A
118	c38566g1i1	frame 3	N/A	N/A
119	c8345g1i1	frame 1	N/A	N/A
120	c49527g1i1	frame 3	N/A	N/A
121	c14449g1i1	frame 6	hypothetical	Mito carr
122	c19643g1i1	frame 6	N/A	N/A
123	c18458g1i1	frame 2	unconventional myosin VIIb	Myosin_head
124	c64889g1i1	frame 3	ATP synthase CF0 C subunit	ATP-synt_C
125	c66242g1i1	frame 3	hypothetical	N/A
126	c41327g1i1	frame 1	N/A	N/A
127	c37994g1i1	frame 2	N/A	N/A
128	c30517g1i1	frame 5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9	NAD_binding_10
129	c44738g1i1	frame 1	N/A	N/A
130	c38048g1i1	frame 6	N/A	N/A
131	c39180g1i1	frame 5	histone H3.3 type 1	Histone
132	c8718g1i1	frame 6	histone H3	Histone
133	c32203g1i1	frame 2	hypothetical	N/A
134	c22259g1i1	frame 4	N/A	N/A
135	c35746g1i1	frame 4	hypothetical	Hexapep 2
136	c39160g1i3	frame 2	N/A	N/A
137	c460g1i1	frame 5	N/A	N/A
138	c28286g1i1	frame 4	hypothetical	Mito carr
139	c33316g1i1	frame 4	N/A	N/A
140	c35759g1i1	frame 6	N/A	N/A
141	c43974g1i2	frame 6	N/A	N/A
142	c43974g1i3	frame 4	N/A	N/A
143	c24146g1i1	frame 1	N/A	N/A
144	c34148g1i1	frame 6	N/A	N/A
145	c43150g2i1	frame 2	N/A	N/A
146	c39294g1i1	frame 1	N/A	N/A
147	c18149g1i1	frame 1	N/A	N/A
148	c42204g1i1	frame 4	N/A	N/A
149	c42931g1i5	frame 3	N/A	N/A

Za použití programu Blast2GO byla provedena rovněž automatická anotace týchž sekvenčních dat, jejíž výsledky byly prakticky shodné s anotací ruční. Následující grafy ukazují podíl zastoupení identifikovaných proteinů podle funkce (obr. 5.8) a předpokládané lokalizace v buňce (obr. 5.9).



**Obr. 5.8:** Rozdělení proteinů identifikovaných programem Blast2GO v proteomu membránové frakce plastidu *E. gracilis* do skupin definovaných v genové ontologii (biologický proces – stupeň 4). Skupiny zastoupené méně než třemi proteiny nejsou zobrazeny.



**Obr. 5.9:** Rozdělení proteinů identifikovaných programem Blast2GO v proteomu membránové frakce plastidu *E. gracilis* do skupin definovaných v genové ontologii (buněčná složka – stupeň 8). Skupiny zastoupené méně než třemi proteiny nejsou zobrazeny.

**Tab. 5.2:** Obsah plastidových, mitochondriálních, porin-like, neidentifikovaných a hypotetických proteinů v membránovém proteomu plastidu *E. gracilis* na základě homologie s proteiny z NCBI zjištěných algoritmem BLAST

	<b>bold red (127 sekvencí)</b>	<b>ostatní (23 sekvencí)</b>
<b>plastidové proteiny</b>	25	1
<b>mitochondriální proteiny</b>	18	0
<b>porin-like proteiny</b>	1	0
<b>hypotetické a nízce skórované proteiny</b>	44	2
<b>bez homologie</b>	20	17

**Tab. 5.3:** Obsah plastidových, mitochondriálních, porin-like a neidentifikovaných proteinů na základě rodin a domén identifikovaných algoritmem Pfam

	<b>bold red (127 sekvencí)</b>	<b>ostatní (23 sekvencí)</b>
<b>plastidové proteiny</b>	24	1
<b>mitochondriální proteiny</b>	15	0
<b>porin-like proteiny</b>	1	0
<b>neidentifikovatelné sekvence</b>	64	18

**Tab. 5.4:** Predikce sekundární struktury hypotetických proteinů podle TMHMM a PRED-TMBB, počty proteinů s transmembránovými helixy (TMH) a proteinů predikovaných jako transmembránové  $\beta$ -barely (TMBB)

	<b>bold red (127 sekvencí)</b>	<b>ostatní (23 sekvencí)</b>
<b>bez TMH</b>	85	21
<b>1 TMH</b>	14	1
<b>2 TMH</b>	11	1
<b>&gt;3 TMH</b>	16	0
<b>TMBB – vysoké skóre</b>	1	0
<b>TMBB – střední skóre</b>	4	0



**Tab. 5.5:** Úplnost N-konců identifikovaných proteinů – počet sekvencí s N-koncovým přesahem oproti blízkým homologům v multiple alignmentu (MA) podle BLAST a sekvencí pravděpodobně začínajících methioninem (M) či splice-leaderem (SL) dle manuální analýzy v BioEdit

	<b>bold red (127 sekvencí)</b>	<b>ostatní (23 sekvencí)</b>
<b>N-koncový přesah v MA</b>	57	18
<b>chybějící N-terminální část dle MA</b>	13	1
<b>M</b>	3	0
<b>SL</b>	52	6

**Tab. 5.6:** N-koncové signální sekvence hypotetických proteinů – počet sekvencí vybavených dle iPSORT klasickým signálním peptidem (SP) a mitochondriálním či chloroplastovým tranzitním peptidem (TP). Je nutné vzít v úvahu, že program postupuje striktně od N-konce, nepozná, zda je tento kompletní, je optimalizován pro rozeznávání „konvenčních“ TP ze živočišných a rostlinných buněk a nepočítá s možností současného výskytu SP a TP.

	<b>bold red (127 sekvencí)</b>	<b>ostatní (23 sekvencí)</b>
<b>SP</b>	6	4
<b>mitochondriální TP</b>	55	8
<b>chloroplastový TP</b>	6	1
<b>SP + chloroplastový TP</b>	0	0

V proteomu nebyly při anotaci identifikovány žádné sekvence prokazatelně homologické s proteiny účastnicími se transportu proteinů do plastidů u jiných organismů. Byl nalezen jeden protein s  $\beta$ -barelickou strukturou náležící do rodiny porinů, který byl za použití programů BLAST, HHPred a HMMER identifikován jako porin vnější mitochondriální membrány.



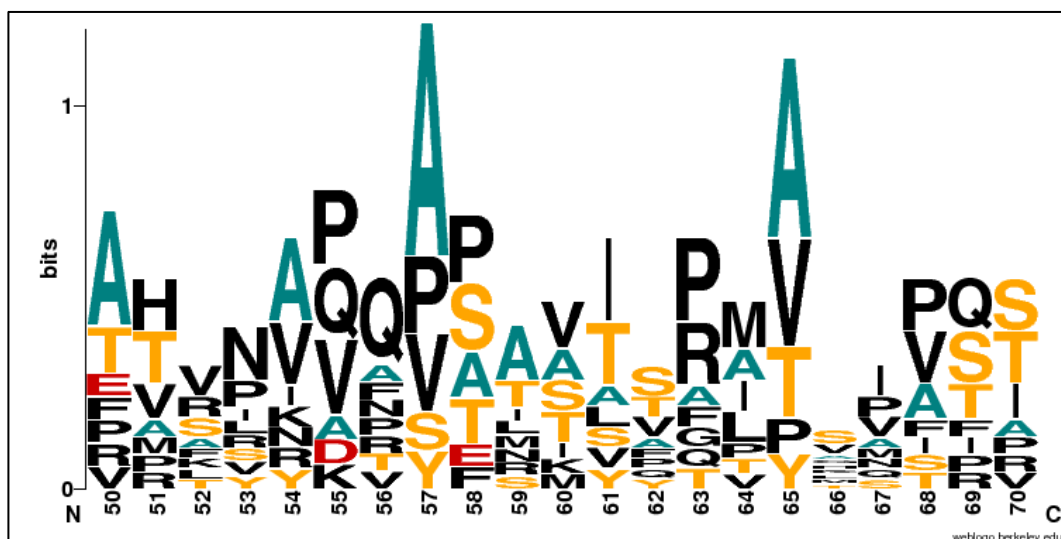
### 5.3.2 Analýza N-terminálních signálních domén

Kompletní N-konec byl nalezen u 61 proteinových sekvencí, z toho u 58 obsahoval do peptidu přeložený splice-leader a u 3 pouze methionin, tedy přeložený start-kodon. Tabulka 5.7 shrnuje výsledky predikcí signálních domén u těchto proteinů provedených za pomoci několika různých nástrojů.

**Tab. 5.7:** Přehled výsledků analýzy N-terminálních úseků 61 proteinových sekvencí s kompletním N-koncem. Byla sledována přítomnost či nepřítomnost signálního peptidu (SP), stop-transfer domény (ST) a tranzitního peptidu (TP). Výsledky byly pro zvýšení citlivosti děleny na prokazatelně negativní, prokazatelně pozitivní a hraniční. K hraničním výsledkům bylo přihlíženo v kontextu výsledků v jiných kategoriích a při použití jiných metod. Aminokyselinové složení hypotetického TP bylo zkoumáno pouze u 22 sekvencí se signifikantním výsledkem alespoň v jedné z ostatních kategorií.

	pozitivní výsledek	hraniční výsledek	negativní výsledek
<b>SP: TMH v oblasti 0-50 (TMHMM)</b>	10	13	38
<b>ST: TMH v oblasti 70-110 (TMHMM)</b>	14	8	39
<b>SP: hydrofobní region v oblasti 0-50 (ProtScale)</b>	16	11	34
<b>ST: hydrofobní region v oblasti 70-110 (ProtScale)</b>	10	15	36
<b>SP (signalp)</b>	10	22	29
<b>SP (plasmoAP)</b>	3	10	48
<b>TP: zvýšený počet S, T, Y v oblasti 50-70</b>	12	5	5
<b>TP: zvýšený počet A v oblasti 50-70</b>	8	4	10
<b>TP: snížený počet D, E v oblasti 50-70</b>	13	2	7

Po celkovém vyhodnocení výsledků bylo identifikováno 12 sekvencí prokazatelně obsahujících N-terminální signál pro transport do plastidu (konkrétní sekvence jsou k nahlédnutí na přiloženém CD). U většiny byl tento závěr navíc potvrzen algoritmem BLAST, který je identifikoval jako homology typicky plastidových proteinů. Z úseků 50–70 těchto sekvencí bylo vytvořeno proteinové logo (obr. 5.10).



**Obr. 5.10:** Proteinové logo potenciálních tranzitních peptidů identifikovaných plastidových, signální doménou vybavených proteinů. Na logu je patrný relativně vysoký obsah hydroxylovaných aminokyselin (žlutá) a alaninu (modrozelená) a naopak nízký počet aminokyselin kyselých (červená).

## 5.4 Hledání potenciálních transportérů v transkriptomu *E. gracilis* a *E. gymnastica* a membránovém proteomu plastidu *E. gracilis*

### 5.4.1 Komponenty komplexů TOC a TIC

V transkriptomu byly třemi nezávislými způsoby vyhledány potenciální homology komponent mašinerie TOC/TIC. Konkrétní počty nalezených sekvencí podle organismu a použité metody jsou uvedeny v tabulce 5.8, k nahlédnutí jsou pak na CD.

**Tab. 5.8:** Přehled počtů sekvencí nalezených v transkriptomech *E. gracilis* a *E. gymnastica* algoritmem HMMER podle různých alignmentů: referenčních sekvencí podjednotek komplexů TOC a TIC stažených z NCBI (refseq), téhož souboru obohaceného o homologы vyhledané v transkriptomech zelených řas (refseq + chlorophyta) a souboru obsahujícího pouze typickými doménami hledaných proteinů (domény).

	refseq		refseq + chlorophyta		domény	
	<i>Euglena</i>	<i>Eutreptiella</i>	<i>Euglena</i>	<i>Eutreptiella</i>	<i>Euglena</i>	<i>Eutreptiella</i>
<b>Tic20</b>	8	0	1	3	4	0
<b>Tic21</b>	6	3	3	1	8	2
<b>Tic22</b>	0	0	2	1	2	1
<b>Tic32</b>	57	21	109	53	94	42
<b>Tic40</b>	56	22	0	0	-	-
<b>Tic55</b>	6	4	5	6	2	3
<b>Tic62</b>	18	19	21	25	13	18
<b>Tic110</b>	0	0	2	0	-	-
<b>Toc12</b>	0	0	0	0	145	67
<b>Toc34</b>	16	9	32	17	13	20
<b>Toc64</b>	143	72	167	85	2	3
<b>Toc75</b>	1	0	1	0	0	0
<b>Toc159</b>	2	7	6	12	0	0

Nalezené sekvence byly zkoumány za použití BLAST a HHPred. Žádná ze sekvencí nebyla identifikována jako některá z podjednotek komplexů TOC a TIC. Jediný pozitivní výsledek, domnělý homolog proteinu Toc34, se nakonec ukázal být rostlinnou kontaminací.

Při prohledávání transkriptomu *E. gracilis* na Toc75 jsme našli nekompletní protein příbuzný Omp85, který byl později identifikován jako mitochondriální SAM50. V transkriptomu byly odhaleny dvě jeho kopie.

### 5.4.2 Komponenty dráhy ERAD

V transkriptomech *E. gracilis* a *E. gymnastica* byly nalezeny potenciální homology některých komponent dráhy ERAD, jejichž počty jsou uvedeny v tabulce 5.9 a konkrétní sekvence jsou k nahlédnutí na CD. V případě Der1 a Hrd3 bylo odhaleno několik podobných sekvencí, které by mohly představovat duplikované kopie těchto proteinů. Žádná z těchto sekvencí však nebyla nalezena v proteomu plastidových membrán *E. gracilis*.

**Tab. 5.9:** Přehled počtů sekvencí z transkriptomů *E. gracilis* a *E. gymnastica* identifikovaných algoritmem HMMER jako homology proteinů dráhy ERAD a výsledky jejich hledání v proteomických datech z plastidových membrán *E. gracilis*.

	<i>Euglena</i> - transkriptom	<i>Euglena</i> - proteom	<i>Eutreptiella</i> - transkriptom
<b>Der1</b>	4	0	1
<b>Hrd1</b>	3	0	2
<b>Hrd3</b>	10	0	1
<b>Usa1</b>	0	0	0
<b>Yos9</b>	5	0	1
<b>Doa10</b>	5	0	0

### 5.4.3 SNARE proteiny

V transkriptomech *E. gracilis* a *E. gymnastica* byly pomocí HMMER vyhledány hypotetické proteiny náležící do rodiny SNARE. V transkriptomu *E. gracilis* bylo nalezeno 13 sekvencí a v transkriptomu *E. gymnastica* 5 sekvencí (konkrétní sekvence na CD). Žádná z nich nebyla následně nalezena v proteomických datech z plastidu *E. gracilis*.

## 6 DISKUZE

Ačkoli jsme optimalizaci metody pro izolaci plastidů věnovali mnoho času, její výsledky zdaleka nejsou dokonalé a skýtají prostor pro vylepšování, na což se v budoucnu také zaměříme. Zásadním problémem práce s jakýmkoli plastidy je již zmíněný „clumping“, shlukování, které výrazně negativně ovlivňuje kvalitu vzorku. Dochází k tvorbě těžko oddělitelných shluků plastidů, které jsou lepkavé, a tudíž se na ně mohou přichytit nejrůznější buněčné struktury či organely, které se snažíme z našeho vzorku v procesu izolace odstranit. Není zcela jasné, co přesně shlukování způsobuje. Roli hraje více faktorů (Doonan 1996; Šuťák, osobní sdělení), úpravy postupu, například změny složení pufrů a délky a způsobu kultivace v experimentu použitých buněk, bude tedy třeba provádět postupně a průběžně vyhodnocovat, jaký měly na míru shlukování vliv. To však podstatně komplikuje fakt, že dosud nemáme k dispozici marker, který by nám umožnil odhalit a kvantifikovat mitochondriální kontaminaci našeho vzorku a pružněji na ni reagovat. Vyzkoušeli jsme mnoho protilátek proti mitochondriálním proteinům z různých organismů včetně relativně blízce příbuzných euglenozoi, nicméně nenašli jsme žádnou, která by mohla sloužit k detekci mitochondriální kontaminace v našem vzorku. Tato nespolehlivost protilátek pravděpodobně souvisí s atypickými vlastnostmi mitochondrie euglenophyt. Je možné, že jejich mitochondriální proteiny jsou výrazněji diverzifikované na sekvenční úrovni či mají netypickou délku. To vše může vést k tomu, že je protilátka nerozeznává. V budoucnu se tedy budeme snažit tento problém vyřešit a získat či sami připravit spolehlivou protilátku pro značení mitochondrií zkoumaných euglenidů, jak na Western blotu, tak ve fluorescenční mikroskopii. Rovněž bude vhodné se v budoucnu při kontrole oddělení membránové a solubilní frakce nespokojit pouze s možností detekovat RbcL z lumen thylakoidů, ale zařadit do kontrolních pokusů i membránový marker.

Ačkoli kvalita vzorku je na pováženou, izolace plastidů a plastidových membrán z *E. gracilis* se zdařila. Rovněž byla připravena celková RNA o poměrně vysoké koncentraci a nepříliš velké míře degradace. Z obou těchto vzorků jsme získali sekvenční data, která bylo možno následně bioinformaticky zpracovávat.

Paralelně jsme prováděli stejné izolační pokusy i s *E. gymnastica*, ty však selhaly. Čistotu izolovaných plastidů a míru kontaminace jinými organelami se nám rovněž nepodařilo

stanovit. Především jsme však při kontrole Western blotem zjistili, že při karbonátové extrakci opakovaně nedochází k oddělení membránové a solubilní frakce. Plastidy euglenophyt jsou morfologicky dosti rozmanité a je možné, že se plastidy *E. gymnastica* od plastidů *E. gracilis* svými fyzikálními vlastnostmi natolik liší, že pro ně nelze použít stejný postup. Pod světelným mikroskopem jsme pozorovali určité rozdíly ve stavu plastidů po celém izolačním procesu: plastidy *E. gymnastica* se jevily více intaktní, patrně tedy lépe odolávají mechanickým i osmotickým tlakům vznikajícím při procesu izolace. Je možné, že plastidy *E. gymnastica* jsou výrazně pevnější než plastidy *E. gracilis* a chemické působení  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  nestačí k jejich rozrušení, jež musí předcházet oddělení jednotlivých frakcí. To může koneckonců souviset i s faktem, že se na rozdíl od *E. gracilis* jedná o mořský organismus. Do pracovního postupu jsme tedy zkoušeli zařadit krátkou sonikaci izolovaných plastidů, která by je mírně mechanicky rozrušila před aplikací  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , zatím však bez výsledku.

Z výsledků automatické i ruční anotace získaných proteomických dat z membrán plastidu *E. gracilis* je evidentní, že se nám nepodařilo vyhnout mitochondriální kontaminaci. Na základě homologů vyhledaných pomocí BLAST bylo mitochondriálních proteinů identifikováno jen o něco méně než proteinů plastidových. To však pochopitelně nemusí odrážet jejich skutečný poměr ve vzorku. Je nutné brát v úvahu, že mitochondriálních sekvencí je v databázích vyšší počet, mohou být lépe anotovány a lépe rozeznatelné. Pomocí programu iPSORT byla jako mitochondriální predikována naprostá většina proteinů. Tento výsledek však není příliš směrodatný, neboť jsme program *de facto* použili k účelu, k němuž neslouží. Je totiž designován na rozeznávání signálních domén v „klasické“ rostlinné buňce a nikoli buňce prvoka se sekundárním plastidem. Je nicméně bez pochyb, že kontaminace je ve vzorku nezanedbatelné množství. To není překvapivé, vzhledem k fyzikálním vlastnostem mitochondrie euglenidů. Ta je nekompaktní, zasahuje do téměř celé cytoplasmy a může se dokonce rozpadat na dílčí váčky, které mohou být velikostí a hmotností podobné plastidům a diferenciální ani gradientovou centrifugací je tedy ze vzorku nelze odstranit. Otázkou tedy je, nakolik je vůbec možné úpravou postupu tuto kontaminaci omezit.

V datech bylo nalezeno poměrně velké množství proteinů s transmembránovými úseky, které ukazují na jejich ukotvení v membráně anebo přítomnost hydrofobního signálního peptidu, který bývá predikcemi programy vyhodnocen jako transmembránový helix. To, zda jsou s membránou asociované, ať už prostřednictvím kotev či interakcí protein-protein, i ostatní proteiny, u nichž nebyla transmembránová doména predikována, nelze s jistotou určit.

Proteom byl velmi chudý na  $\beta$ -barelické proteiny. Obzvláště v případě podjednotek systému TOC, které mohou mít extrémní vlastnosti a tvořit velké komplexy, připadá v úvahu systémová chyba: komplexy tvořené mnoha podjednotkami či extrémně hydrofobní proteiny mohou odolávat denaturaci SDS a nevstupovat do gelu (Varga, osobní sdělení). Tak jsme mohli přijít o potenciálně zajímavé proteiny, které by se mohly týkat membránového transportu v plastidech. V budoucnu plánujeme právě z tohoto důvodu použít metodu „blue-native“ elektroforézy, při níž nedochází k denaturaci proteinů a je možné je sledovat a z gelu izolovat v komplexech, jichž jsou součástí. Uvažujeme též o způsobu, kterým vzorek o membránové  $\beta$ -barely naopak obohatit. Plánujeme vyzkoušet metodu, která využívá přidaných proteáz, které by měly naštěpit většinu proteinů ve vzorku, ale kterým by měly nejlépe a nejdéle odolat právě v membráně integrované  $\beta$ -barely (Freitag *et al.* 1982; Doležal, osobní sdělení).

V proteomu byl nalezen jediný porin-like protein. Nešlo o plastidový transportér, ale porin vnější mitochondriální membrány tvořící pravděpodobně napětím ovládaný iontový kanál. Bezmála polovina sekvencí nebyla pomocí použitých algoritmů pro vyhledávání homologií jednoznačně identifikována, sekvence vykazovaly velmi nízké skóre či žádnou homologii s proteiny v databázi. To je ovšem při sekvenaci nového vzorku z organismu a organely, jejíž proteiny nebyly dosud širěji zkoumány a anotovány, vcelku očekávatelné.

Pro účely této práce byla vygenerována velká transkriptomová databáze složená z dat z různých zdrojů, z nichž jedním, a nikoli nepodstatným, byla naše vlastní data získaná sekvenací RNA. Použití této databáze výrazně vylepšilo výsledky našich analýz oproti původnímu stavu, kdy jsme používali pouze v té době na NCBI dostupná data z EST (Výsledky těchto předběžných analýz s nekompletními transkriptomickými daty nejsou součástí této práce.). Počet identifikací provedených programem Mascot, tedy proteinů v proteomu, se sice paradoxně snížil, nicméně jejich kvalita vzrostla. To je patrné především na poměru „bold red“ a „non bold red“ sekvencí. Méně signifikantní sekvence činily při použití původních dat zhruba polovinu, nyní pouze sedminu z celkového počtu identifikací. Sekvence byly rovněž delší a kompletnější a umožnily analyzovat N-terminální domény na výrazně větším vzorku oproti původnímu stavu, kdy N-konec ve většině sekvencí chyběl.

Ukázalo se, že databáze obsahuje rostlinnou kontaminaci. Tu jsme odhalili, když jsme důkladněji zanalyzovali potenciálně zajímavý výsledek hledání homologu proteinu Toc34

a odhalili jej jako falešně pozitivní a pocházející ze *Solanum lycopersicum*. Při následném screeningu celé databáze na kontaminaci z tohoto zdroje, který provedla Mgr. Anna Karnkowska, Ph.D., bylo odhaleno dalších 1200 sekvencí. To je relativně malé množství, jež bude možné odfiltrovat a neovlivní použitelnost databáze v budoucnu. Při sekvenaci metodou Illumina jsou podobné kontaminace datasetů poměrně běžné a není dost dobře možné se jim vyhnout. Metoda je velmi citlivá a proto stačí minimální množství cizího materiálu, např. jediné pylové zrno dotýčné rostliny, aby se kontaminace projevila ve vygenerovaných datech.

Při analýze signálních domén u proteinů s kompletním N-koncem byl odhalen signální a tranzitní peptid a ve většině případů i stop-transfer doména u množství proteinů, z nichž většina byla podle výsledků BLAST a Pfam identifikována jako plastidová a navíc u několika neidentifikovatelných sekvencí. Aminokyselinový profil hypotetických tranzitních peptidů těchto proteinů odpovídá dosavadním poznatkům. Výhledově by na jeho základě mohl být vytvořen skript pro jeho automatickou predikci ze sekvence.

Při práci s transkriptomovou databází *E. gracilis* a *E. gymnastica* za použití algoritmu HMMER bylo na základě referenčních sekvencí identifikováno množství proteinů z rodiny SNARE, které však nebyly nalezeny v proteomu. Toto zjištění je v souladu se závěry Slávikové a Vaculy, kteří ze svých inhibičních experimentů usoudili, že vezikulární transport mezi plastidovými membránami euglenophyt je na SNARE proteinech nezávislý (Sláviková, Vacula *et al.* 2005).

Homology proteinů dráhy ERAD byly nalezeny v transkriptomických datech obou zkoumaných euglenophyt, v případě dvou centrálních jednotek, Der1 a Hrd3, pak v několika sekvenčně mírně odlišných kopiích. To by mohlo naznačovat, že se u euglenophyt nachází duplikovaná verze tohoto systému, nebo alespoň jeho části, která by mohla hrát roli v transportu proteinů do plastidu, jako je tomu u plastidu skupin Apicomplexa, Heterokontophyta, Cryptophyta a Haptophyta. V proteomu *E. gracilis* však nebyla nalezena žádná z těchto sekvencí. Vzhledem k relativně nízké kvalitě našeho proteinového vzorku však na základě toho nelze činit závěry. Naopak je třeba se na toto téma v budoucnu zaměřit, neboť mechanismus odvozený od dráhy ERAD je poměrně silným kandidátem na systém, jímž by mohla probíhat část transportu proteinů do plastidu.

V obou transkriptomických databázích bylo nalezeno množství identifikací pro různé komponenty komplexů TOC a TIC. Na základě homologů vyhledaných algoritmy BLAST



a HHPred však byly prakticky všechny odmítnuty jako proteinům Toc a Tic zcela nepříbuzné. Při hledání homologu Toc75 jsme identifikovali pouze jemu vzdáleně příbuzný mitochondriální transportér SAM50. Ten se v transkriptomu vyskytoval ve dvou kopiích, z nichž jedna by teoreticky mohla pocházet z chlorofytního endosymbionta, z něhož se do jádra *E. gracilis* dostala horizontálním genovým transferem. Důkladnější analýza těchto sekvencí pomocí BLAST a dalších algoritmů vyhledávajících homologie ale tuto domněnku nepotvrdila (Žárský, osobní sdělení), nalezená sekvence je navíc nekompletní. I tak se však jedná o zajímavý výsledek, k němuž se máme v úmyslu vrátit, až budeme mít k dispozici kompletnější genomická či transkriptomická data.

Použití tří různých přístupů nebylo bez užitku, ukázalo se, že u různých vyhledávaných proteinů fungují různě citlivě a rozhodně hrají roli. To ovšem nic nemění na tom, že nakonec všechny přinesly pouze negativní výsledky. Mnohé podjednotky je patrně náročné odhalit, jelikož jejich konzervované domény nejsou ani zdaleka typické pouze pro ně. Množství podjednotek se například účastní signalizace na základě redoxního potenciálu (Tic32, Tic62, Tic55), za což zodpovídají funkční domény, které se vyskytují u velkého množství proteinů (short-chain dehydrogenase, Rieske apod.). Nicméně ani v případě proteinů s unikátními doménami (Tic20, Tic22, Toc34, Toc75) nebyly nalezeny žádné příbuzné sekvence. To nemusí být způsobeno nepřítomností genů pro zkoumané proteiny, ale například tím, že jsou příliš diverzifikované a na sekvenční úrovni vzdálené svým homologům z jiných organismů. Ohledně transportu přes vnitřní dvě membrány euglenophyt a případné přítomnosti součástí TOC/TIC systému v dostupných sekvenčních datech nebyly dosud publikovány prakticky žádné výsledky (Bolte *et al.* 2009; Agrawal *et al.* 2010). Na tento fakt jsme tedy reagovali touto důkladnější analýzou, která by mohla odhalit i vzdálenější homology a zároveň prozkoumat přímo proteiny, které se prokazatelně fyzicky nacházejí v plastidových membránách. Naše výsledky pátrání po homolozích podjednotek systémů TOC a TIC v *E. gracilis* i *E. gymnastica* jsou však negativní.

Existují tři možnosti, jak tyto negativní výsledky interpretovat:

- 1) Komponenty systémů TOC a TIC či jiné transportéry jsou v *E. gracilis* přítomny a byly přítomny rovněž v našich transkriptomických datech. Jsou však natolik evolučně vzdálené a na sekvenční úrovni nepodobné svým homologům z jiných organismů, že nebyly algoritmem HMMER odhaleny. Tato možnost se nám nicméně

zdá nepravděpodobná, neboť HMMER je dosti citlivý a schopný vyhledat i velmi vzdálené homologie. Navíc jsme pro jistotu použili několik přístupů pro případ, že by se některý z nich ukázal jako citlivější či naopak málo citlivý.

- 2) Komponenty systémů TOC a TIC či jiné transportéry jsou v *E. gracilis* přítomny, mohly se nacházet i v proteinovém vzorku plastidových membrán, avšak jejich sekvence chyběly v naší transkriptomické databázi a kvůli tomu nebyly identifikovány ani jedním z programů Mascot a HMMER. Vzhledem k tomu, že sekvenace genomu *E. gracilis* v rámci projektu vedeného prof. Markem Fieldem z University of Cambridge stále běží a my nezískali přístup ani k částečným datům, není možné odhadnout, jak kompletní je vlastně transkriptom, který jsme měli k dispozici. I přes značnou velikost a délku contigů může obsahovat pouze část celkové RNA. Rovněž může vedle zmíněných sekvencí ze *Solanum lycopersicum* obsahovat další kontaminace, jejichž přítomnost jen dosud nebyla odhalena. Popsaná možnost se nám jeví jako nejpravděpodobnější. V budoucnu tedy budeme pokračovat ve snaze vylepšit metodu pro izolaci plastidů a získat čistější a kompletnější proteinový vzorek z jejich membrán, který využijeme, až budou k dispozici genomická data. Pokud se naskytne příležitost se na zmíněném genomickém projektu touto cestou podílet, rozhodně se jí zhostíme.
- 3) Komponenty systémů TOC a TIC v *E. gracilis* přítomny nejsou. Tato možnost je pochopitelně nejzajímavější, jejím připsušením se ale dostáváme do poněkud atypické a problematické situace, kdy je zkoumána a dokazována nikoli existence, nýbrž neexistence nějakého jevu. Vyvstává otázka, jakým způsobem a za použití jakých metod přistupovat k výzvě, která by před námi takto vyvstala: pokusit se zjistit, jakým způsobem jsou tedy jaderně kódované proteiny do plastidů euglenophyt transportovány, pokud v nich klasický TOC/TIC systém skutečně chybí. Vodítkem by nám v tom případě mohl být právě systém odvozený od dráhy ERAD, jehož přítomnost či nepřítomnost jsme neměli možnost zkoumat příliš do podrobnosti, či pro několik proteinů navrhované, avšak stále příliš neprobádané alternativní mechanismy transportu přes membrány primárního plastidu (Miras *et al.* 2002; Nada *et al.* 2004; Radhamony *et al.* 2006; Stengel *et al.* 2007).

## 7 ZÁVĚREČNÉ SHRNUÍ

- Byla vyvinuta metoda pro izolaci plastidů z *E. gracilis* a *E. gymnastica*, jejíž výsledky jsou uspokojivé, ale nikoli dokonalé. Proces extrakce membrán z izolovaných plastidů dopadl úspěšně jen u *E. gracilis*.
- Připravený proteinový vzorek z membránové frakce plastidů *E. gracilis* byl sekvenován metodou hmotnostní spektrometrie, bylo identifikováno 149 proteinů.
- Z *E. gracilis* byla izolována a následně sekvenována totální RNA. Asembláží získaných a ve veřejných databázích dostupných dat byla připravena transkriptomová databáze pro další bioinformatické zpracování.
- Byla provedena ruční i automatická anotace proteomických dat z membránové frakce plastidu *E. gracilis*, v rámci níž nebyly odhaleny žádné potenciální transportéry. V transkriptomech byly identifikovány proteiny z rodiny SNARE a komponenty dráhy ERAD, některé ve více kopiích, žádný z nich však nebyl přítomen v proteomu membránové frakce. Při analýze transkriptomu *E. gracilis* a *E. gymnastica* pomocí skrytých Markovových modelů nebyly ani jedním z použitých postupů identifikovány homology žádné z podjednotek komplexů TOC a TIC. I po důkladné bioinformatické analýze stále negativní výsledky jsou nejspíše důsledkem nízké kvality našeho proteinového vzorku a nekompletnosti transkriptomické databáze. V úvahu však připadá i možnost, že se nejedná o výsledky falešně negativní a je možné, že v plastidu *E. gracilis* možná nejsou přítomny systémy pro transport proteinů známé z primárních plastidů a plastidů jiných skupin sekundárních řas.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>A</b>	alanin
<b>AP</b>	alkalická fosfatáza
<b>ATP</b>	adenosin trifosfát
<b>BGI</b>	Beijing Genomics Institute
<b>BLAST</b>	basic local alignment search tool
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin
<b>CAH</b>	carbonic anhydrase
<b>cAMP</b>	cyklický adenosin monofosfát
<b>CBB</b>	Coomsie brilliant blue
<b>cDNA</b>	komplementární DNA
<b>CER</b>	chloroplastové endoplasmatické retikulum
<b>Cpn</b>	chaperonin
<b>D</b>	kyselina asparagová
<b>DEPC</b>	diethylpyrokarbonát
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	destilovaná H <sub>2</sub> O
<b>DIC</b>	differential interference contrast
<b>DUF</b>	domain of unknown function
<b>E</b>	kyselina glutamová
<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>ER</b>	endoplasmatické retikulum
<b>ERAD</b>	degradační dráha endoplasmatického retikula
<b>EST</b>	expressed sequence tag
<b>FNR</b>	ferredoxin-NADP reduktáza
<b>GCSH</b>	glycine cleavage system protein H
<b>Grx</b>	glutaredoxin
<b>GTP</b>	guanosin trifosfát
<b>HMM</b>	skrytý Markovův model
<b>Isd11</b>	iron-sulfur protein biogenesis, desulfurase-interacting protein
<b>LTD</b>	lumen-targetovací doména
<b>M</b>	methionin
<b>MA</b>	multiple alignment
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie
<b>mtDNA</b>	mitochondriální DNA
<b>NAD</b>	nikotinamid adenin dinukleotid
<b>NADP</b>	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>nifSb</b>	cystein desulfuráza
<b>OEP</b>	outer envelope protein
<b>PAGE</b>	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
<b>PaO</b>	pheophorbide a oxygenase
<b>PBS</b>	fosfátový pufr

<b>PFO</b>	pyruvát-ferredoxin oxidoreduktáza
<b>PNO</b>	pyruvát-NADP oxidoreduktáza
<b>RER</b>	drsné endoplasmatické retikulum
<b>RuBisCO</b>	ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenia
<b>S</b>	serin
<b>SAM</b>	sorting assembly machinery
<b>SAR</b>	Stramenopila, Alveolata, Rhizaria
<b>SCCAP</b>	Scandinavian Culture Collection of Alga and Protozoa
<b>SDR</b>	short-chain dehydrogenase/reduktase
<b>SDS</b>	dodecylsulfát sodný
<b>SELMA</b>	symbiont-specific ERAD-like machinery
<b>SER</b>	hladké endoplasmatické retikulum
<b>SL</b>	splice-leader
<b>SP</b>	signální peptid
<b>SPP</b>	stromální procesující peptidáza
<b>SRA</b>	sequence read archive
<b>sRNA</b>	small RNA
<b>SRP</b>	signal-recognition partije
<b>ST</b>	stop-transfer
<b>T</b>	threonin
<b>TEMED</b>	tetramethylethyldiamin
<b>TIC</b>	translokáza vnitřní chloroplastové membrány
<b>TIM</b>	translokáza vnitřní mitochondriální membrány
<b>TMBB</b>	transmembránový $\beta$ -barel
<b>TMH</b>	transmembránový helix
<b>TOC</b>	translokáza vnější chloroplastové membrány
<b>TOM</b>	translokáza vnější mitochondriální membrány
<b>TP</b>	tranzitní peptid
<b>TPR</b>	tetratrico peptid repeat
<b>ÚMG AV</b>	Ústav molekulární genetiky Akademie věd
<b>Y</b>	tyrosin

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Agrawal, S., *et* Striepen, B. (2010). More membranes, more proteins: complex protein import mechanisms into secondary plastids. *Protist*, 161(5), 672–87.
- Agrawal, S., van Dooren, G. G., Beatty, W. L., *et* Striepen, B. (2009). Genetic evidence that an endosymbiont-derived endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD) system functions in import of apicoplast proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(48), 33683–91.
- Apt, K. E. (2002). In vivo characterization of diatom multipartite plastid targeting signals. *Journal of Cell Science*, 115(21), 4061–4069.
- Apt, K. E., Collier, J. L., *et* Grossman, A. R. (1995). Evolution of the phycobiliproteins. *Journal of Molecular Biology*, 248(1), 79–96.
- Archibald, J. M. (2009). The puzzle of plastid evolution. *Current Biology: CB*, 19(2), R81–8.
- Baurain, D., Brinkmann, H., Petersen, J., Rodríguez-Ezpeleta, N., Stechmann, A., Demoulin, V., ... Philippe, H. (2010). Phylogenomic evidence for separate acquisition of plastids in cryptophytes, haptophytes, and stramenopiles. *Molecular Biology and Evolution*, 27(7), 1698–709.
- Benz, J. P., Stengel, A., Lintala, M., Lee, Y.-H., Weber, A., Philippar, K., ... Bölder, B. (2009). Arabidopsis Tic62 and ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase form light-regulated complexes that are integrated into the chloroplast redox poise. *The Plant Cell*, 21(12), 3965–83.
- Bernhard, J. M., *et* Bowser, S. S. (1999). Benthic foraminifera of dysoxic sediments: chloroplast sequestration and functional morphology. *Earth-Science Reviews*, 46(1-4), 149–165.
- Bolte, K., Bullmann, L., Hempel, F., Bozarth, A., Zauner, S., *et* Maier, U.-G. (2009). Protein targeting into secondary plastids. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(1), 9–15.
- Bullmann, L., Haarmann, R., Mirus, O., Bredemeier, R., Hempel, F., Maier, U. G., *et* Schleiff, E. (2010). Filling the gap, evolutionarily conserved Omp85 in plastids of chromalveolates. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(9), 6848–56.
- Burki, F., Okamoto, N., Pombert, J.-F., *et* Keeling, P. J. (2012). The evolutionary history of haptophytes and cryptophytes: phylogenomic evidence for separate origins. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 279(1736), 2246–54.
- Cavalier-Smith, T. (1999). Principles of Protein and Lipid Targeting in Secondary Symbiogenesis: Euglenoid, Dinoflagellate, and Sporozoan Plastid Origins and the Eukaryote Family Tree, 2. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 347–366.

- Cavalier-Smith, T. (2000). Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends in Plant Science*, 5(4), 174–182.
- Cavalier-Smith, T. (2002). Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses. *Current Biology*, 12(2), 62–64.
- Cline, K., Henry, R., *et* Li, C. (1993). Multiple pathways for protein transport into the thylakoid membrane or across, 12(1), 4105–4114.
- DeRocher, A. E., Coppens, I., Karnataki, A., Gilbert, L. A., Rome, M. E., Feagin, J. E., ... Parsons, M. (2008). A thioredoxin family protein of the apicoplast periphery identifies abundant candidate transport vesicles in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryotic Cell*, 7(9), 1518–29.
- Dieckmann, C. L. (2003). Eyespot placement and assembly in the green alga *Chlamydomonas*. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 25(4), 410–6.
- Doetsch, N. a, Favreau, M. R., Kuscuoglu, N., Thompson, M. D., *et* Hallick, R. B. (2001). Chloroplast transformation in *Euglena gracilis*: splicing of a group III twintron transcribed from a transgenic psbK operon. *Current Genetics*, 39(1), 49–60.
- Doonan S. (1996). Protein Purification Protocols. Springer Science *et* Business Media.
- Dorrell, R. G., *et* Smith, A. G. (2011). Do red and green make brown?: perspectives on plastid acquisitions within chromalveolates. *Eukaryotic Cell*, 10(7), 856–68.
- Douglas, S., Zauner, S., Fraunholz, M., Beaton, M., Penny, S., Deng, L. T., ... Maier, U. G. (2001). The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. *Nature*, 410(6832), 1091–6.
- Durnford, D. G., *et* Gray, M. W. (2006). Analysis of *Euglena gracilis* plastid-targeted proteins reveals different classes of transit sequences. *Eukaryotic Cell*, 5(12), 2079–91.
- Felsner, G., Sommer, M. S., *et* Maier, U. G. (2010). The physical and functional borders of transit peptide-like sequences in secondary endosymbionts. *BMC Plant Biology*, 10(1), 223.
- Flegontov, P., Gray, M. W., Burger, G., *et* Lukeš, J. (2011). Gene fragmentation: a key to mitochondrial genome evolution in Euglenozoa? *Current Genetics*, 57(4), 225–32.
- Freitag, H., Neupert, W., *et* Benz, R. (2005). Purification and Characterisation of a Pore Protein of the Outer Mitochondrial Membrane from *Neurospora crassa*. *European Journal of Biochemistry*, 123(3), 629–636.
- Fujiki, Y., Hubbard, A. L., Fowler, S., *et* Lazarow, P. B. (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*, 93(1), 97–102.

- Gantt, E., Edwards, M. R., *et* Provasoli, L. (1971). Chloroplast structure of the Cryptophyceae. Evidence for phycobiliproteins within intrathylakoidal spaces. *The Journal of Cell Biology*, 48(2), 280–90.
- Gibbs, S. P. (1978). The chloroplasts of *Euglena* may have evolved from symbiotic green algae. *Canadian Journal of Botany*, 56(22), 2883–2889.
- Gibbs, S. P. (1981). The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 361, 193–208.
- Gile, G. H., *et* Keeling, P. J. (2008). Nucleus-encoded periplastid-targeted EFL in chlorarachniophytes. *Molecular Biology and Evolution*, 25(9), 1967–77.
- Gilson, P. R., Su, V., Slamovits, C. H., Reith, M. E., Keeling, P. J., *et* McFadden, G. I. (2006). Complete nucleotide sequence of the chlorarachniophyte nucleomorph: nature's smallest nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(25), 9566–71.
- Gilson, P., *et* McFadden, G. I. (1995). The chlorarachniophyte: a cell with two different nuclei and two different telomeres. *Chromosoma*, 103(9), 635–641.
- Gould, S. B., Fan, E., Hempel, F., Maier, U.-G., *et* Klösgen, R. B. (2007). Translocation of a phycoerythrin alpha subunit across five biological membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(41), 30295–302.
- Green, B. J., Li, W. Y., Manhart, J. R., Fox, T. C., Summer, E. J., Kennedy, R. A., ... Rumpho, M. E. (2000). Mollusc-algal chloroplast endosymbiosis. Photosynthesis, thylakoid protein maintenance, and chloroplast gene expression continue for many months in the absence of the algal nucleus. *Plant Physiology*, 124(1), 331–42.
- Hampl, V., Silberman, J. D., Stechmann, A., Diaz-Triviño, S., Johnson, P. J., *et* Roger, A. J. (2008). Genetic evidence for a mitochondriate ancestry in the “amitochondriate” flagellate *Trimastix pyriformis*. *PloS One*, 3(1), e1383.
- Hausmann K., Hülsmann N. (1996). Protozoology. Georg Thieme Verlag.
- Hayashi, Y., *et* Ueda, K. (1989). The shape of mitochondria and the number of mitochondrial nucleoids during the cell cycle of *Euglena gracilis*, 6(3).
- Hedges, S. B., Blair, J. E., Venturi, M. L., *et* Shoe, J. L. (2004). A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evolutionary Biology*, 4, 2.
- Hempel, F., Bullmann, L., Lau, J., Zauner, S., *et* Maier, U. G. (2009). ERAD-derived preprotein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms. *Molecular Biology and Evolution*, 26(8), 1781–90.



- Hempel, F., Felsner, G., *et* Maier, U. G. (2010). New mechanistic insights into pre-protein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms. *Molecular Microbiology*, 76(3), 793–801.
- Hirakawa, Y., Burki, F., *et* Keeling, P. J. (2012). Genome-based reconstruction of the protein import machinery in the secondary plastid of a chlorarachniophyte alga. *Eukaryotic Cell*, 11(3), 324–33. doi:10.1128/EC.05264-11
- Hirakawa, Y., Nagamune, K., *et* Ishida, K. (2009). Protein targeting into secondary plastids of chlorarachniophytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12820–5.
- Hofmann, N. R., *et* Theg, S. M. (2005). Chloroplast outer membrane protein targeting and insertion. *Trends in Plant Science*, 10(9), 450–7.
- Hopkins, J., Fowler, R., Krishna, S., Wilson, I., Mitchell, G., *et* Bannister, L. (1999). The plastid in *Plasmodium falciparum* asexual blood stages: a three-dimensional ultrastructural analysis. *Protist*, 150(3), 283–95.
- Hsu, S.-C., Nafati, M., *et* Inoue, K. (2012). OEP80, an essential protein paralogous to the chloroplast protein translocation channel Toc75, exists as a 70-kD protein in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast outer envelope. *Plant Molecular Biology*, 78(1-2), 147–58.
- Hyams, J. S. (1982). The *Euglena* paraflagellar rod: structure, relationship to other flagellar components and preliminary biochemical characterization. *Journal of Cell Science*, 55, 199–210.
- Chaal, B. K., *et* Green, B. R. (2005). Protein import pathways in “complex” chloroplasts derived from secondary endosymbiosis involving a red algal ancestor. *Plant Molecular Biology*, 57(3), 333–42.
- Inagaki, J., Fujita, Y., Hase, T., *et* Yamamoto, Y. (2000). Protein translocation within chloroplast is similar in *Euglena* and higher plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(2), 436–442. doi:10.1006/bbrc.2000.3702
- Iseki, M., Matsunaga, S., Murakami, A., Ohno, K., Shiga, K., Yoshida, K., ... Watanabe, M. (2002). A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature*, 415(6875), 1047–1051.
- James, T. W., Crescitelli, F., Loew, E. R., *et* McFarland, W. N. (1992). The eyespot of *Euglena gracilis*: a microspectrophotometric study. *Vision Research*, 32(9), 1583–1591.
- Jarvis, P., *et* Robinson, C. (2004). Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Current Biology: CB*, 14(24), R1064–77.
- Jarvis, P., *et* Soll, J. (2001). Toc, Tic, and chloroplast protein import. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1541(1-2), 64–79.

- Karlin, S., Brocchieri, L., Mrazek, J., Campbell, A. M., *et* Spormann, A. M. (1999). A chimeric prokaryotic ancestry of mitochondria and primitive eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(16), 9190–9195.
- Karnataki, A., Derocher, A. E., Coppens, I., Feagin, J. E., *et* Parsons, M. (2007). A membrane protease is targeted to the relict plastid of toxoplasma via an internal signal sequence. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 8(11), 1543–53.
- Keeling, P. J. (2009). Chromalveolates and the evolution of plastids by secondary endosymbiosis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(1), 1–8.
- Köhler, S. (2005). Multi-membrane-bound structures of Apicomplexa: I. the architecture of the *Toxoplasma gondii* apicoplast. *Parasitology Research*, 96(4), 258–72.
- Kovács-Bogdán, E., Benz, J. P., Soll, J., *et* Bölter, B. (2011). Tic20 forms a channel independent of Tic110 in chloroplasts. *BMC Plant Biology*, 11(1), 133.
- Künkele, K.-P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F. E., Benz, R., Thieffry, M., ... Neupert, W. (1998). The Preprotein Translocation Channel of the Outer Membrane of Mitochondria. *Cell*, 93(6), 1009–1019.
- Kuo, R. C., Zhang, H., Zhuang, Y., Hannick, L., *et* Lin, S. (2013). Transcriptomic Study Reveals Widespread Spliced Leader Trans-Splicing, Short 5'-UTRs and Potential Complex Carbon Fixation Mechanisms in the Euglenoid Alga *Eutreptiella* sp. *PLoS ONE*, 8(4), e60826.
- Laval-Peuto, M., *et* Febvre, M. (1986). On plastid symbiosis in *Tontonia appendiculariformis* (Ciliophora, Oligotrichina). *Bio Systems*, 19(2), 137–58.
- Leander, B. S. (2004). Did trypanosomatid parasites have photosynthetic ancestors? *Trends in Microbiology*, 12(6), 251–8.
- Leander, B. S., *et* Farmer, M. A. (2000). Comparative morphology of the euglenid pellicle. I. Patterns of strips and pores. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(5), 469–79.
- Leander, B. S., *et* Farmer, M. A. (2001). Comparative morphology of the euglenid pellicle. II. Diversity of strip substructure. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(2), 202–17.
- Leedale, G. (1967). *Euglenoid flagellates*. Prentice-Hall.
- Logsdon, J. M. (2010). Eukaryotic evolution: the importance of being archaeobacterial. *Current Biology: CB*, 20(24), R1078–9.
- Lukeš, J., Archibald, J. M., Keeling, P. J., Doolittle, W. F., *et* Gray, M. W. (2011). How a neutral evolutionary ratchet can build cellular complexity. *IUBMB Life*, 63(7), 528–37.
- Maréchal, E., *et* Cesbron-Delauw, M. F. (2001). The apicoplast: a new member of the plastid family. *Trends in Plant Science*, 6(5), 200–5.

- Marin, B., Nowack, E. C. M., *et* Melkonian, M. (2005). A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist*, 156(4), 425–32.
- Martin, W. (2005). Archaeobacteria (Archaea) and the origin of the eukaryotic nucleus. *Current Opinion in Microbiology*, 8(6), 630–7.
- Martin, W., *et* Müller, M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*, 392(6671), 37–41.
- Mason, C. B., Bricker, T. M., *et* Moroney, J. V. (2006). A rapid method for chloroplast isolation from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature Protocols*, 1(5), 2227–30.
- McFadden, G. I., *et* van Dooren, G. G. (2004). Evolution: red algal genome affirms a common origin of all plastids. *Current Biology: CB*, 14(13), R514–6.
- Mereschkowsky, K. (1910). Theorie der zwei Plasmaarten als Grundlage der Symbiogenese, einer neuen Lehre von der Entstehung der Organismen. *Biologisches Centralblatt*, 30, 278–367.
- Minge, M. a, Shalchian-Tabrizi, K., Tørresen, O. K., Takishita, K., Probert, I., Inagaki, Y., ... Jakobsen, K. S. (2010). A phylogenetic mosaic plastid proteome and unusual plastid-targeting signals in the green-colored dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 191.
- Minnhagen, S., Carvalho, W. F., Salomon, P. S., *et* Janson, S. (2008). Chloroplast DNA content in *Dinophysis* (Dinophyceae) from different cell cycle stages is consistent with kleptoplasty. *Environmental Microbiology*, 10(9), 2411–7.
- Miras, S., Salvi, D., Ferro, M., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J., *et* Rolland, N. (2002). Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47770–8.
- Miyoshi, Y., Tsubo, Y. (1969). Permanent bleaching of *Euglena* by chloramphenicol. *Plant Cell Physiol.*, 10(1), 221–225.
- Monfils, A. K., Triemer, R. E., *et* Bellairs, E. F. (2011). Characterization of paramylon morphological diversity in photosynthetic euglenoids (Euglenales, Euglenophyta). *Phycologia*, 50(2), 156–169.
- Moore, C. E., *et* Archibald, J. M. (2009). Nucleomorph genomes. *Annual Review of Genetics*, 43, 251–64.
- Nada, A., *et* Soll, J. (2004). Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 17), 3975–82.
- Nassoury, N., Cappadocia, M., *et* Morse, D. (2003). Plastid ultrastructure defines the protein import pathway in dinoflagellates. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 14), 2867–74.

- Nassoury, N., *et* Morse, D. (2005). Protein targeting to the chloroplasts of photosynthetic eukaryotes: getting there is half the fun. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1743(1-2), 5–19.
- Okamoto, N., *et* Inouye, I. (2006). *Hatena arenicola* gen. et sp. nov., a katablepharid undergoing probable plastid acquisition. *Protist*, 157(4), 401–19.
- Okamoto, N., Chantangsi, C., Horák, A., Leander, B. S., *et* Keeling, P. J. (2009). Molecular phylogeny and description of the novel katablepharid *Roombia truncata* gen. et sp. nov., and establishment of the Hacrobia taxon nov. *PloS One*, 4(9), e7080.
- Oreb, M., Tews, I., *et* Schleiff, E. (2008). Policing Tic ‘n’ Toc, the doorway to chloroplasts. *Trends in Cell Biology*, 18(1), 19–27.
- Osafune, T. (1973). Three-dimensional Structures of Giant Mitochondria, Dictyosomes and “Concentric Lamellar Bodies” Formed during the Cell Cycle of *Euglena gracilis* (Z) in Synchronous Culture. *Microscopy (Tokyo)*, 22(1), 51–61.
- Patron, N. J., *et* Waller, R. F. (2007). Transit peptide diversity and divergence: A global analysis of plastid targeting signals. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 29(10), 1048–58.
- Patron, N. J., Waller, R. F., Archibald, J. M., *et* Keeling, P. J. (2005). Complex protein targeting to dinoflagellate plastids. *Journal of Molecular Biology*, 348(4), 1015–24.
- Perez, E., Lapaille, M., Degand, H., Cilibrasi, L., Villavicencio-Queijeiro, A., Morsomme, P., ... Cardol, P. (2014). The mitochondrial respiratory chain of the secondary green alga *Euglena gracilis* shares many additional subunits with parasitic Trypanosomatidae. *Mitochondrion*, 1–12.
- Radhamony, R. N., *et* Theg, S. M. (2006). Evidence for an ER to Golgi to chloroplast protein transport pathway. *Trends in Cell Biology*, 16(8), 385–7.
- Rapoport, T. A. (2008). Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *The FEBS Journal*, 275(18), 4471–8.
- Raven, J. A. (2003). Carboxysomes and peptidoglycan walls of cyanobacteria: possible physiological functions. *European Journal of Phycology*, 38(1), 47–53.
- Reumann, S. (1999). The endosymbiotic origin of the protein import machinery of chloroplastic envelope membranes. *Trends in Plant Science*, 4(8), 302–307.
- Reumann, S., Davila-Aponte, J., *et* Keegstra, K. (1999). The evolutionary origin of the protein-translocating channel of chloroplastic envelope membranes: Identification of a cyanobacterial homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(2), 784–789.
- Rice, D. W., *et* Palmer, J. D. (2006). An exceptional horizontal gene transfer in plastids: gene replacement by a distant bacterial paralog and evidence that haptophyte and cryptophyte plastids are sisters. *BMC Biology*, 4, 31.

- Richmond M. H., et Smith D. C. (1979). The cell as a habitat. The Royal Society.
- Riisberg, I., Orr, R. J. S., Kluge, R., Shalchian-Tabrizi, K., Bowers, H. A., Patil, V., ... Jakobsen, K. S. (2009). Seven gene phylogeny of heterokonts. *Protist*, 160(2), 191–204.
- Rogers, M. B., Gilson, P. R., Su, V., McFadden, G. I., et Keeling, P. J. (2007). The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte *Bigeloviella natans*: Evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts. *Molecular Biology and Evolution*, 24(1), 54–62.
- Roy, J., Faktorová, D., Lukeš, J., et Burger, G. (2007). Unusual mitochondrial genome structures throughout the Euglenozoa. *Protist*, 158(3), 385–96.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14, 255–274.
- Shi, L. X., et Theg, S. M. (2013). The chloroplast protein import system: from algae to trees. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(2), 314–31.
- Schimper, A. F. W. (1883). Ueber die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Botanische Zeitung*, 41, 105–160.
- Schleiff, E., et Becker, T. (2011). Common ground for protein translocation: access control for mitochondria and chloroplasts. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12(1), 48–59.
- Sláviková, S., Vacula, R., Fang, Z., Ehara, T., Osafune, T., et Schwartzbach, S. D. (2005). Homologous and heterologous reconstitution of Golgi to chloroplast transport and protein import into the complex chloroplasts of *Euglena*. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 8), 1651–1661.
- Sommer, J., Joachim, R. (1965). The ultrastructure of the pellicle complex of *Euglena gracilis*. *J Cell Biol.*, (24), 253–257.
- Sommer, M. S., Daum, B., Gross, L. E., Weis, B. L. M., Mirus, O., Abram, L., ... Schleiff, E. (2011). Chloroplast Omp85 proteins change orientation during evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(33), 13841–6.
- Spector D. L. (1984). Dinoflagellates. Academic Press, Inc.
- Spork, S., Hiss, J. a, Mandel, K., Sommer, M., Kooij, T. W. a, Chu, T., ... Przyborski, J. M. (2009). An unusual ERAD-like complex is targeted to the apicoplast of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic Cell*, 8(8), 1134–45.
- Stengel, A., Benz, J. P., Buchanan, B. B., Soll, J., et Bölter, B. (2009). Preprotein import into chloroplasts via the Toc and Tic complexes is regulated by redox signals in *Pisum sativum*. *Molecular Plant*, 2(6), 1181–97.

- Stengel, A., Soll, J., et Bölter, B. (2007). Protein import into chloroplasts: new aspects of a well-known topic. *Biological Chemistry*, 388(8), 765–72.
- Sulli, C., Fang, Z., Muchhal, U., et Schwartzbach, S. D. (1999). Topology of Euglena chloroplast protein precursors within endoplasmic reticulum to Golgi to chloroplast transport vesicles. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(1), 457–463.
- Takahashi, F., Okabe, Y., Nakada, T., Sekimoto, H., Ito, M., Kataoka, H., et Nozaki, H. (2007). Origins of the secondary plastids of Euglenophyta and Chlorarachniophyta as revealed by an analysis of the plastid-targeting, nuclear-encoded gene psbO 1. *Journal of Phycology*, 43(6), 1302–1309.
- Tessier, L. H., Keller, M., Chan, R. L., Fournier, R., Weil, J. H., et Imbault, P. (1991). Short leader sequences may be transferred from small RNAs to pre-mature mRNAs by trans-splicing in Euglena. *The EMBO Journal*, 10(9), 2621–5.
- Tonkin, C. J., Struck, N. S., Mullin, K. a, Stimmler, L. M., et McFadden, G. I. (2006). Evidence for Golgi-independent transport from the early secretory pathway to the plastid in malaria parasites. *Molecular Microbiology*, 61(3), 614–30.
- Tsai, J.-Y., Chu, C.-C., Yeh, Y.-H., Chen, L.-J., Li, H.-M., et Hsiao, C.-D. (2013). Structural characterizations of the chloroplast translocon protein Tic110. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 75(5), 847–57.
- Turmel, M., Gagnon, M.-C., O’Kelly, C. J., Otis, C., et Lemieux, C. (2009). The chloroplast genomes of the green algae Pyramimonas, Monomastix, and Pycnococcus shed new light on the evolutionary history of prasinophytes and the origin of the secondary chloroplasts of euglenids. *Molecular Biology and Evolution*, 26(3), 631–48.
- Van de Peer, Y., Rensing, S. A., Maier, U. G., et De Wachter, R. (1996). Substitution rate calibration of small subunit ribosomal RNA identifies chlorarachniophyte endosymbionts as remnants of green algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), 7732–7736.
- Van Dooren, G. G., Tomova, C., Agrawal, S., Humbel, B. M., et Striepen, B. (2008). Toxoplasma gondii Tic20 is essential for apicoplast protein import. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), 13574–9.
- Vothknecht, U. C., et Soll, J. (2005). Chloroplast membrane transport: interplay of prokaryotic and eukaryotic traits. *Gene*, 354, 99–109.
- Waller, R. F., et McFadden, G. I. (2005). The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Current Issues in Molecular Biology*, 7(1), 57–79.
- Wastl, J., et Maier, U. G. (2000). Transport of proteins into cryptomonads complex plastids. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 23194–8.
- Wolowski, K., et Hindák F. (2005). Atlas of Euglenophytes. Veda.

- Yamaguchi, A., Yubuki, N., *et* Leander, B. S. (2012). Morphostasis in a novel eukaryote illuminates the evolutionary transition from phagotrophy to phototrophy: description of *Rapaza viridis* n. gen. et sp. (Euglenozoa, Euglenida). *BMC Evolutionary Biology*, 12(1), 29.
- Yamaguchi, H., Nakayama, T., Hongoh, Y., Kawachi, M., *et* Inouye, I. (2014). Molecular diversity of endosymbiotic *Nephroselmis* (Nephroselmidophyceae) in *Hatena arenicola* (Katablepharidophycota). *Journal of Plant Research*, 127(2), 241–7.
- Yoon, H. S., Hackett, J. D., Ciniglia, C., Pinto, G., *et* Bhattacharya, D. (2004). A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 21(5), 809–18.
- Yoon, H. S., Hackett, J. D., Van Dolah, F. M., Nosenko, T., Lidie, K. L., *et* Bhattacharya, D. (2005). Tertiary endosymbiosis driven genome evolution in dinoflagellate algae. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5), 1299–308.
- Yoon, H. S., Nakayama, T., Reyes-Prieto, A., Andersen, R. A., Boo, S. M., Ishida, K.-I., *et* Bhattacharya, D. (2009). A single origin of the photosynthetic organelle in different *Paulinella* lineages. *BMC Evolutionary Biology*, 9, 98.
- Zubáčová, Z., Novák, L., Bublíková, J., Vacek, V., Fousek, J., Rídl, J., ... Hampl, V. (2013). The mitochondrion-like organelle of *Trimastix pyriformis* contains the complete glycine cleavage system. *PloS One*, 8(3), e55417.